Versuche zur Charakterisierung der zellvermittelten Anti-Tumor-Immunität bei Patienten mit Karzinomen des Gastrointestinaltraktes

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Susanne Kopf geb. Thierer
aus Göppingen

1980

80 325

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548919_0075

Versuche zur Charakterisierung der zellvermittelten Anti-Tumor-Immunität bei Patienten mit Karzinomen des Gastrointestinaltraktes

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Susanne Kopf geb. Thierer
aus Göppingen

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	22. Mai 1980
Dekan	Prof. Dr. W. Seyffert
1. Berichterstatter	Prof. Dr. F. A. Anderer
2. Berichterstatter	Prof. Dr. V. Braun

Ich danke Herrn Prof. Dr. F.A. Anderer für die Überlassung des Themas und für die intensive und effektive Betreuung der Arbeit.

Meinen Eltern
und meinem Mann

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung.....1
II. Ergebnisse.....6
A. Isolierung einer geeigneten Zielzelle für die Zytotoxizitätsteste.....7
1. Zellen mit CEA-Oberflächenantigen.....7
2. Biologische und biochemische Kriterien der Zielzelle.....9
a) Wachstums- und Einbaurate.....9
b) CEA als Oberflächenkomponente auf der Zielzelle.....14
c) CEA-Sezernierung in das Kulturmedium.....17
d) CEA-Gehalt in den Zellen.....19
e) In vivo Passage der zu untersuchenden Zell-Linien in Nacktmäusen.....20
B. Präparation der Effektorzellen.....21
C. Lymphozyten-Zytotoxizitätsteste.....25
1. Vormarkierung der Zielzellen.....26
2. Bestimmung der Lymphozyten-Zytotoxizität.....27
3. Lymphozyten-Zytotoxizität bei Patienten und gesunden Personen.....29
4. Stimulationskontrollen mit Phytohämagglutinin...34
D. Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität durch CEA-Immunkomplexe.....37
E. Patientenüberwachung durch CEA-spezifische Lymphozyten-Zytotoxizität.....51
F. CEA-spezifische Lymphozyten-Stimulation.....58
G. Zusammenfassung.....65
H. Diskussion.....68
I. Material.....73
K. Methoden.....79
L. Literaturverzeichnis.....89

I. EINLEITUNG

Nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung ist weitgehend abgesichert, daß die meisten Tumorzellen an der Zelloberfläche Antigene zeigen, die bei normalen Zellen nicht nachzuweisen sind. Hierbei lassen sich die Gruppe der tumor-spezifischen Antigene (TSSA) von den tumor-assoziierten Antigenen (TASA) unterscheiden. Tumor-spezifische Antigene sind dadurch definiert, daß sie spezifisch für eine bestimmte Tumorart sind, z.B. bei virusinduzierten Tumoren, und sonst nie bei normalen Zellen vorkommen. Tumor-assoziierte Antigene sind zelluläre Komponenten, die normalerweise in der ausdifferenzierten Zelle reprimiert sind und durch entsprechende Mechanismen der Onkogenese dereprimiert werden, wie z.B. die onko-foetalen Antigene (1).

Entsprechend den von Burnet und Thomas geforderten Mechanismen der immunologischen Überwachung ("immunological surveillance") der Onkogenese wird davon ausgegangen, daß Tumorantigene von maligne transformierten Zellen vom Organismus als "fremd" erkannt und abgestoßen werden müßten (2,3). Bei der Immunantwort auf Tumoroberflächenantigene sollte dabei ein ähnlicher Mechanismus ablaufen wie bei der Abstoßung allogener Transplantate. Die Zerstörung entstehender Fremd- bzw. Tumorzellen geschieht in erster Linie durch die Stimulierung der zellulären Immunreaktion, bei der vorallem T-Lymphozyten und Makrophagen gezielt die Tumorzellen angreifen und zur Lyse derselben führen (4). Bei der humoralen Immunreaktion, die auch parallel zur zellulären Immunreaktion ablaufen kann, kommt es zur Bildung von humoralen Antikörpern, die spezifisch auf die neu auftretenden Oberflächenantigene ausgerichtet sind. Diese können zytotoxisch sein, können aber auch z.B. durch die Bildung von Immunkomplexen mit löslichem

Tumorantigen den Immunstatus eines Tumorpatienten negativ beeinflußen.

Es gab lange Zeit keine Erklärung dafür, daß trotz beobachteter zellulärer und humoraler Immunität in vitro, fortschreitendes Tumorwachstum in vivo stattfindet. Mehrere verschiedene Mechanismen wurden von Hellström erörtert, um dieses Phänomen zu erklären (5). Auf der einen Seite ging er davon aus, daß Antikörper gegen die Tumorantigene gebildet werden, bevor sich die zellvermittelte spezifische Immunantwort entwickeln kann. Diese Antikörper umschließen die Antigen tragenden Tumorzellen wie ein Mantel und maskieren so die Antigenstrukturen auf der Oberfläche dieser Zellen. Die Immunlymphozyten werden somit daran gehindert, in unmittelbaren Kontakt mit den Tumorzellen zu kommen. Auf diese Weise beschleunigt die humorale Immunantwort sogar das Tumorwachstum ("enhancement"). Diese theoretische Erklärung wurde durch einige Versuche von Hellström unterstützt, in denen spezifische, die Tumorabwehr blockierende Faktoren im Serum tumortragender Tiere und Menschen nachgewiesen werden konnten (6). Durch Adsorption des Serums mit Tumorantigenen wurde die blockierende Wirkung aufgehoben.

Auf der anderen Seite ergaben weitere Arbeiten von Hellström und Sjörgren, daß nicht allein den Antikörpern die hemmende Wirkung auf die zellulären Abwehrmechanismen zugeschrieben werden konnten (7,8,9). Hellström vermutete, daß Antigen-Antikörper-Komplexe an der Hemmung beteiligt sind, da bei der Entfernung von Tumoren auch die blockierenden Faktoren nicht mehr vorhanden waren. Auch andere Autoren, wie Baldwin und Nind haben auf die Bedeutung von zirkulierenden Immunkomplexen zwischen Tumorantigenen und ihren Antikörpern hingewiesen (10,11). Man geht von der Vorstellung aus, daß sich diese Komplexe mit ihrem spezifischen Antikörper-Fc-Teil an die entsprechenden Lymphozytenrezeptoren binden. Die dadurch bedingte Blockierung

der Lymphozyten könnte somit für die nicht erfolgende Tumorabstoßung verantwortlich sein.

Eine große Rolle wird von einigen Autoren außerdem der Bindung von zirkulierenden Tumorantigenen an die Lymphozytenoberfläche zuerkannt, da eine Konkurrenz im Erkennungsmechanismus für Tumoroberflächenantigene und frei zirkulierende Tumorantigene stattfindet (5,10,11,12,13).

Ein tumor-assoziiertes Antigen, das für manche menschliche Tumoren große Bedeutung erlangt hat, ist das Carcinoembryonale Antigen (CEA), das zuerst von Gold und Freedman 1965 beschrieben wurde und das genetisch determiniert in einem bestimmten Embryonalstadium gebildet und danach reprimiert wird (14,15). Für das CEA im Foetus werden verschiedene mögliche Funktionen diskutiert. CEA könnte u.a. im Verlauf der verschiedenen Differenzierungsstufen im Foetus gebildet werden und verhindern, daß der Foetus von der Mutter wie ein Allotransplantat abgestoßen wird (16). CEA könnte andererseits zur Organentwicklung des Foetuses notwendig sein als einer der spezifischen Effektoren in bestimmten Organen mit einer definierten Aufgabe in einem begrenzten Zeitraum (17). Im Serum von erwachsenen gesunden Personen ist CEA meist nicht nachweisbar, bis auf Ausnahmefälle, bei denen CEA in sehr geringen Mengen zu finden ist. Bei 65 % aller malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes wurde festgestellt, daß der CEA-Spiegel stark erhöht vorliegt (18,19,20). Bei rund 50 % anderen Tumorarten und auch bei nicht malignen Erkrankungen kann jedoch der CEA-Gehalt im Serum erhöht sein, so daß die ursprünglich angenommene ausschließliche Spezifität als Indikation für Magen-Darm-Karzinome nicht zutreffend ist (18,19).

CEA kann durch Elektronenmikroskopie und Immunfluoreszenz-Methoden an der Glykokalyx von malignen Tumorzellen und foetalen Zellen nachgewiesen werden (21,22,23). Aus der Glykokalyx dieser Tumorzellen und foetalen Zellen wird CEA

sezerniert und gelangt so in die Blutbahn.

Aus den bisherigen Beobachtungen erhebt sich vorallem bei Patienten mit erhöhten CEA-Konzentrationen im Serum die Frage, ob eine Immunantwort auf dieses Antigen zu erwarten ist, oder ob eine grundsätzliche Toleranz gegen foetale Antigene vorliegt. Gold beschrieb als erster 1967 zirkulierende, gegen CEA gerichtete Antikörper bei Patienten mit nicht metastasierenden Tumoren des Magen-Darm-Traktes sowie bei schwangeren Frauen und zeigte somit die ersten Fälle von Autoantigenität des CEA auf (24). Weitere Arbeiten von Gold 1972 und 1973, Holburn 1974, McSween 1975 und Rosenthal 1975 konnten die Anwesenheit von CEA-Antikörpern bestätigen (25,26,27,28,29). Gegensätzliche Ergebnisse wurden von Collatz 1971 und LoGerfo 1972 berichtet, die mit verschiedenen Techniken die Existenz von zirkulierenden CEA-Antikörpern nicht nachweisen konnten (30,31). Bei einem Überschuß an freiem CEA im Serum muß jedoch angenommen werden, daß CEA-spezifische Antikörper überwiegend als CEA-Immunkomplexe vorliegen. Als auch der Nachweis von CEA-Immunkomplexen in den Seren von Patienten mit malignen Erkrankungen im Magen-Darm-Trakt erbracht werden konnte, lag die Vermutung nahe, daß auch im Falle von CEA als tumor-assoziiertes Antigen die Tumorabstoßung durch Antigen-Antikörper-Komplexe verhindert werden könnte (32,33). Mit der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) konnten Carrel 1977 und Shoham 1979 die durch heterologe CEA-Antikörper bedingte spezifische Lyse von Tumorzellen aufzeigen (34,35). Die zellvermittelte Immunität gegen CEA wurde durch Zytotoxizitätsversuche von Nairn bekräftigt, der Patienten mit malignen kolo-rektalen Tumoren untersuchte (36).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der zellulären Immunität gegen CEA bei Patienten mit malignen gastrointestinalen Tumoren. Dabei sollen Routine-Methoden für einen CEA-spezifischen zellvermittelten Zyto-

toxizitätstest erarbeitet werden und durch Vorversuche Kriterien für eine geeignete Zielzelle festgelegt werden. Diese Zielzelle soll aus menschlichem Tumormaterial isoliert werden und CEA als Oberflächenantigen besitzen. Ferner soll bei vorhandener Zytotoxizität der Patientenimmunlymphozyten die mögliche Hemmung durch Serum und Serumfraktionen untersucht werden, um eine blockierende Wirkung von CEA-Immunkomplexen näher zu charakterisieren. Außer der zytotoxischen Methode zur Abklärung der zellulären Immunität sollen auch Versuche unternommen werden, durch Stimulation mit CEA spezifisch sensible Patientenlymphozyten nachzuweisen, um weitere Anhaltspunkte zur Frage der zellulären Immunabwehr zu erhalten. Alle Untersuchungen sind auch mit gesunden Kontrollpersonen durchzuführen.

II. ERGEBNISSE

Die zelluläre Immunreaktion bei Patienten mit Karzinomen des Gastrointestinaltraktes wird im wesentlichen durch zytotoxische Lymphozyten vermittelt, die hinsichtlich definierter Tumorantigene sensibilisiert sind. Für in vitro-Teste ist es daher wichtig, eine geeignete Zielzelle verfügbar zu haben, die mindestens ein definiertes Tumorantigen trägt. Als Meßparameter können nun einerseits Teste herangezogen werden, die eine spezifische Sensibilisierung der Patientenlymphozyten belegen, andererseits kann die Fähigkeit von Patientenlymphozyten benützt werden, entsprechende Zielzellen (Tumorzellen) in vitro zu zerstören.

Die spezifische Sensibilisierung wird dadurch nachgewiesen, daß entsprechende Lymphozyten durch das spezifische Tumorantigen zur Proliferation (DNS-Synthese) stimuliert werden (37,38). Zum Nachweis der spezifischen Zytotoxizität der Patientenlymphozyten im in vitro-Test bedient man sich am besten einer humanen Tumorzell-Primärkultur oder einer permanenten humanen Zell-Linie, die ein oder mehrere Tumorantigen (e) als Zelloberflächenkomponenten trägt, die auch im Patienten nachgewiesen werden können (39,40,41). Bei gastrointestinalen Tumoren ist sehr häufig (in ca. 65 % der Fälle) das Carcinoembryonale Antigen (CEA) als tumor-assoziiertes Antigen an der Zelloberfläche feststellbar (18,19,20,42). Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit eine menschliche Zell-Linie ausgewählt, die CEA als Membrankomponente besitzt und in Kultur auch sezerniert.

A. Isolierung einer geeigneten Zielzelle für die Zytotoxizitätsteste

1. Zellen mit CEA-Oberflächenantigen

Zur Durchführung der Zytotoxizitätsteste mußte eine Zielzelle zur Verfügung stehen, die CEA als Oberflächenkomponente besitzt sowie eine hohe Wachstumsrate und damit eine hohe Einbaurate für radioaktiv markierte Moleküle aufweist, die durch ihre Wiedergabe eine Lyse der Zellen anzeigen. Der erste Versuchsteil beschränkte sich zunächst darauf, aus Biopsiematerial von menschlichen malignen Tumoren des Magen-Darm-Traktes Primärkulturen anzulegen. Das Biopsiematerial wurde im Operationssaal möglichst steril entnommen, in kleine Stücke geschnitten und anschließend in Antibiotikalösung gewaschen. Danach wurden die kleinen Gewebestücke in Kulturmedium bei 37 °C inkubiert. Es wurden 22 Primärkulturen angelegt, die aus

2 Pankreas-
9 Magen-
7 Sigma-
3 Kolon-
1 Rektum-Primärkarzinomen

stammten (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1:
Zell-Linien aus Biopsiematerial

Patient	Organ des Primärkarzinoms	Biopsiematerial von
1	Pankreas	Pankreaskopf
2	Magen	Cardia-Lymphknoten
3	Sigma	solider Tumor
4	Sigma	lokale Metastase
5	Kolon	solider Tumor
6	Magen	Netz
7	Magen	Schleimhaut
8	Pankreas	solider Tumor
9	Magen	Cardia
10	Magen	Cardia
11	Kolon	solider Tumor
12	Magen	solider Tumor
13	Sigma	solider Tumor
14	Rektum	Lebermetastase
15	Magen	Lebermetastase
16	Sigma	solider Tumor
17	Sigma	solider Tumor
18	Kolon	solider Tumor
19	Sigma	solider Tumor
20	Magen	Cardia
21	Sigma	Lebermetastase
22	Magen	Lebermetastase

2. Biologische und biochemische Kriterien der Zielzelle

a) Wachstums- und Einbaurate

Die Wachstumsrate der zu untersuchenden Zell-Linien wurde nach mindestens 5 Zellpassagen durch Aussäen von 1×10^5 Zellen in 75 cm^2 Zellkulturflaschen bestimmt. Die optimale Zelldichte in den Flaschen war bei schnell wachsenden Zellen nach 2 bis 3 Tagen erreicht, bei sehr langsam wachsenden Zellen erst nach 14 bis 20 Tagen, wobei eine 10 bis 12-fache Vermehrung der Zellen erfolgte. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt.

Zur näheren Charakterisierung der Zell-Linien wurde die Einbaurate zwischen Zellpassage 5 und 10 sowie zwischen 10 und 15 untersucht. Dazu wurden zu einer 5 ml Zellsuspension von 2×10^5 Zellen pro ml 100 µCi ^{14}C-Nicotinamid zugegeben und nach dem Aussäen in Mikrotestplatten (10 µl bzw. 2×10^3 Zellen pro Einzelprobe) im begasten Brutschrank inkubiert (43,44). In Tabelle 2 sind die biologischen und biochemischen Kriterien der Primärkulturen sowie einer permanenten Zell-Linie einander gegenübergestellt. Es zeigte sich, daß kein direkter Zusammenhang zwischen der Wachstumsrate und der Rate der Nicotinamid-Aufnahme besteht. Außerdem konnte kein signifikanter Unterschied in der Aufnahme von Nicotinamid zwischen den Zellpassagen einer einzelnen Zell-Linie beobachtet werden.

Tabelle 2:

Charakterisierung der Primärkulturen und der permanenten Zell-Linie HT 29 durch die Kriterien der optimalen Wachstumsrate, der Einbaurate von ^{14}C-Nicotinamid und ^{3}H-Prolin, der CEA-Sekretion ins Medium, des CEA-Gehaltes der Zellen und der relativen Intensität der indirekten Immunfluoreszenz

Patient	optimale Wachstumsrate (Zelldichte nach Tagen)	Einbaurate (^{14}C-Nicotinamid in cpm)	Einbaurate (^{3}H-Prolin in cpm)	CEA-Sekretion ins Medium in ng/ml	CEA-Gehalt der Zellen in ng/ml	Relative Intensität der indirekten Immunfluoreszenz
1	Zelle wächst sehr schlecht, dadurch keine Bestimmung möglich!					
2	4	6 000	20 000	0,2	0,5	+
3	3	9 000	22 000	5,25	5,85	+++
4	3	9 500	-	1,75	1,5	-
5	Zelle wächst sehr schlecht, dadurch keine Bestimmung möglich!					
6	10	13 500	15 000	1,35	0,25	-
7	8	6 000	-	4,3	1,2	-
* 8 A	3	20 000	18 000	2,7	0,15	+++
B	6	23 000	18 000	0,3	0	-
C	10	10 000	12 500	0	0,15	-
9	15	15 000	-	1,85	0	-
10	12	6 000	-	0,6	1,6	-
11	Zelle wächst sehr schlecht, dadurch keine Bestimmung möglich!					
12	10	5 500	-	0,3	0,7	-
13	7	9 000	20 000	2,2	2,5	++
14	14	12 000	-	0,4	1,6	-
15	Zelle wächst sehr schlecht, dadurch keine Bestimmung möglich!					
16	14	11 500	25 000	0,9	0,25	+
17	20	9 500	-	3,85	0,25	-
18	17	7 000	-	1,7	0	-
19	10	15 000	-	1,9	0	-
20	4	10 000	17 000	5,0	2,1	++
21	12	6 000	-	2,5	0	-
22	15	8 500	-	1,2	1,0	-
HT 29	3	18 000	40 000	36,8	10,5	+++
** K I	3	9 000	-	0	0	-
K II	2	12 000	26 000	0,1	0	-
K III	5	14 000	-	0	0	-
*** K IV	2	-	-	0	0	+++

zu Tabelle 2:

* Die Zell-Linie 8 wies morphologisch sich unterscheidende Zellen auf, die durch verschiedene Ablösungsverfahren voneinander getrennt werden konnten, so daß Zell-Linie 8 A, B und C entstand.

** K I, K II und K III sind 3 permanente menschliche Fibroblasten-Zell-Linien, die als Negativ-Kontrollzellen dienten.

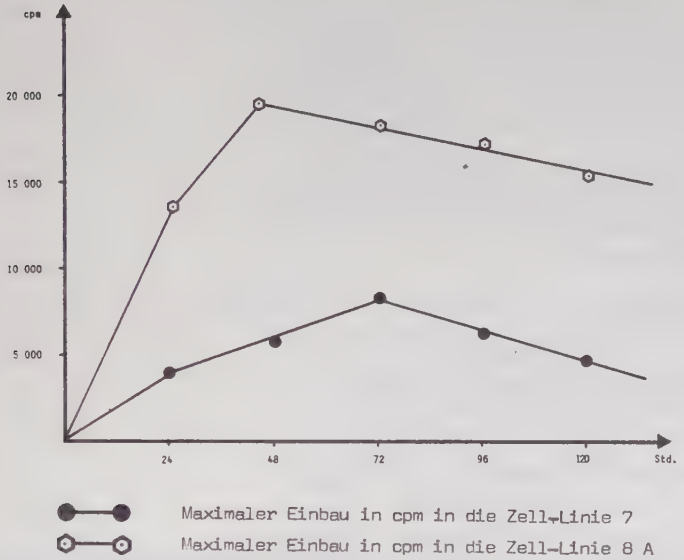
*** K IV ist eine Rous-Sarkom-Virus transformierte Maus-Embryonalzelle, die in den Immunfluoreszenz-Untersuchungen als Positiv-Kontrollzelle verwendet wurde.

Bei einigen Zell-Linien wurde der Einbau von ^{14}C-Nicotinamid in zeitlicher Abhängigkeit untersucht. Es wurde festgestellt, daß bei einer Inkubationszeit von 48 bis 72 Stunden eine optimale Einbaurate erzielt werden kann (siehe Abbildung 1). Die maximale Einbaurate wurde auf folgende Weise bestimmt: Durch Abklopfen der Mikrotestplatten wurde das Medium und die nicht festgewachsenen Zellen entfernt. Die anhaftenden Zellen wurden mit einer 1 %-igen SDS-Lösung lysiert und das Lysat von jeweils 6 Einzelproben wurde zu einer Zählprobe gesammelt. Nach Auswerten der Proben im Szintillationszähler wurden die Einbauraten der verschiedenen Zell-Linien untereinander verglichen. Die spontane Freisetzung der Radioaktivität ins Medium wurde nach Waschen der festgewachsenen Zellen mit Medium und Inkubation in frischem Medium für 24 bis 72 Stunden untersucht. Nach Beendigung des Versuchs wurde das Überstandsmedium abpipettiert und die wiederfreigesetzte Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. In Tabelle 3 sind die erhaltenen Ergebnisse für 2 Zell-Linien tabellarisch erfaßt.

In der Literatur wurde ^{14}C-Nicotinamid im wesentlichen nur für Kurzzeit-(4 Stunden)-Versuche benützt, da es aufgrund seines geringen Molekulargewichtes schon bei einer Permeabilitätsänderung der Zellmembran wieder aus der Zelle austreten kann (43,44,45). Bei einem länger andauernden Versuch (48-72 Stunden) ist daher die spontane Freisetzung von ^{14}C-Nicotinamid relativ hoch (siehe auch Tabelle 3) und somit sind die Meßwerte der Zytolyse relativ ungenau. Deshalb wurde auch die ^{3}H-Prolin-Aufnahme bei mehreren der zu untersuchenden Zell-Linien überprüft (45). Der ^{3}H-Prolin-Einbau in die Zellen wurde entsprechend dem Einbau von ^{14}C-Nicotinamid durchgeführt. Wie aus Tabelle 2 zu entnehmen ist, konnten mit ^{3}H-Prolin meistens höhere Einbauraten erzielt werden. Ferner waren die spontanen Freisetzungsraten wesentlich geringer als die des Nicotinamids.

Abbildung 1:

Graphische Darstellung des Einbaus von ^{14}C-Nicotinamid in die Zell-Linie 7, Passage 9 und in die Zell-Linie 8 A, Passage 6



Maximaler Einbau in cpm in die Zell-Linie 7

Maximaler Einbau in cpm in die Zell-Linie 8 A

Tabelle 3:

Beispiele für den Einfluß der Inkubationszeit auf die Aufnahme und Freisetzung von ^{14}C-Nicotinamid

Zell-Linie 7, Passage 9					
Inkubationszeit	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Maximaler Einbau in cpm	3 980	5 850	8 390	6 230	4 850
Spontane Freisetzung ins Medium in cpm	590	1 090	2 270	2 480	2 760
Spontane Freisetzung ins Medium in %	15 %	19 %	27 %	39 %	57 %
Zell-Linie 8 A, Passage 6					
Inkubationszeit	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Maximaler Einbau in cpm	13 630	19 850	18 530	17 390	15 820
Spontane Freisetzung ins Medium in cpm	2 930	5 500	6 410	8 110	9 980
Spontane Freisetzung ins Medium in %	21 %	27 %	35 %	47 %	63 %

Neben den Zell-Linien aus Biopsiematerial stand eine kontinuierliche Kolon-Karzinom Zell-Linie zur Verfügung, die als CEA sezernierende Zelle vielfach beschrieben wurde (29,34,35,40,46,47,48,49,50,51,52,53). Diese Zell-Linie HT 29 wurde in Bezug auf ihr Wachstums- und Einbauverhalten sowie die CEA-Sekretion mit den anderen Zell-Linien verglichen, um die geeignetste Zielzelle ermitteln zu können. Die Tabelle 2 zeigt, daß die Zell-Linie HT 29 die höchste ^{3}H-Prolin-Einbaurate aufweist.

b) CEA als Oberflächenkomponente auf der Zielzelle

Für CEA-spezifische Zell-Zell-Reaktionen (z.B. bei zytotoxischen Lymphozyten) ist es wichtig, daß CEA als Oberflächenkomponente in genügend hoher Konzentration vorliegt. Es war daher notwendig, entsprechende vergleichende Untersuchungen durchzuführen. Mit der indirekten Immunfluoreszenz-Technik kann CEA als Bestandteil der Tumorzelloberfläche nachgewiesen werden (21,22,23). Die zu untersuchenden Zellen wurden auf Deckgläschen gezüchtet und nach einigen Stunden Wachstum - so, daß noch jede einzelne Zelle erkennbar war - fixiert. Danach wurden die Zellen mit Anti-CEA-Kaninchenserum inkubiert und anschließend mit Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-konjugiertem Anti-Kaninchen-IgG von der Ziege angefärbt. Zur Beurteilung der Zellpräparate im UV-Fluoreszenzmikroskop wurden zum Vergleich menschliche Fibroblasten als Negativ-Kontrollzellen herangezogen. Es konnten bei den Zell-Linien 2,3,8 A,13,16,20 und HT 29 deutliche Färbung der Zelloberfläche beobachtet werden, wobei die Färbung in ihrer Intensität Unterschiede aufwies (siehe Tabelle 2).

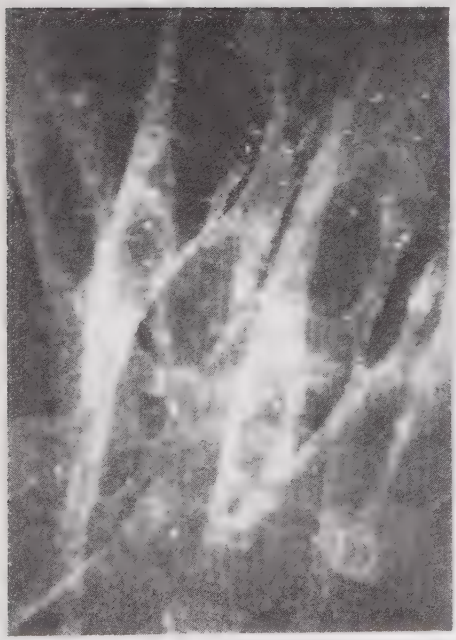
Um die Spezifität des verwendeten FITC-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG der Ziege beurteilen zu können, wurden Rous-

Sarkom-Virus transformierte STU-Maus-Embryonalzellen (Schmidt-Ruppin-Stamm, STU-D 17) mit Anti-STU-D 17 Antiserum vom Kaninchen als Positiv-Kontrolle inkubiert und danach mit dem FITC-konjugierten Serum angefärbt. Auch bei diesen Zellen war positive Immunfluoreszenz vom Intensitätsgrad +++ erkennbar.

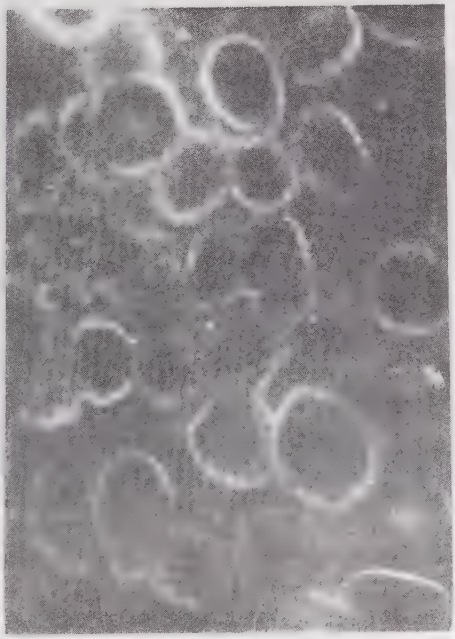
Beispiele für die Immunfluoreszenz der verschiedenen Zellen sind in Abbildung 2 wiedergegeben.

Abbildung 2:
Beispiele für (a) CEA-spezifische Immunfluoreszenz
(b) Negativ-Kontrolle mit normalen menschlichen Fibroblasten
(c) Positiv-Kontrolle mit Maus-D 17-Zellen/Antiserum vom Kaninchen/Anti-Kaninchen-Antiserum von der Ziege

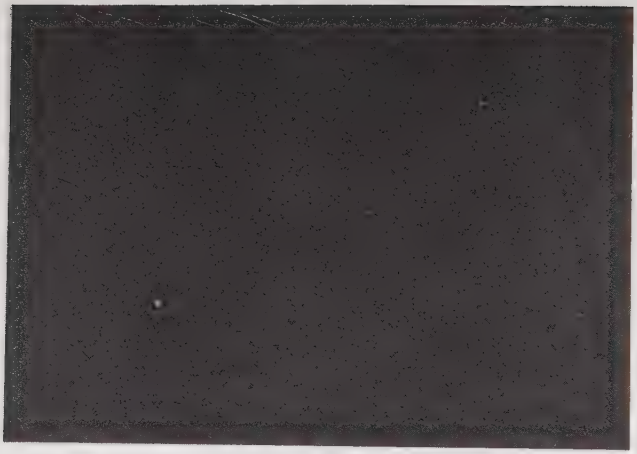
(a)



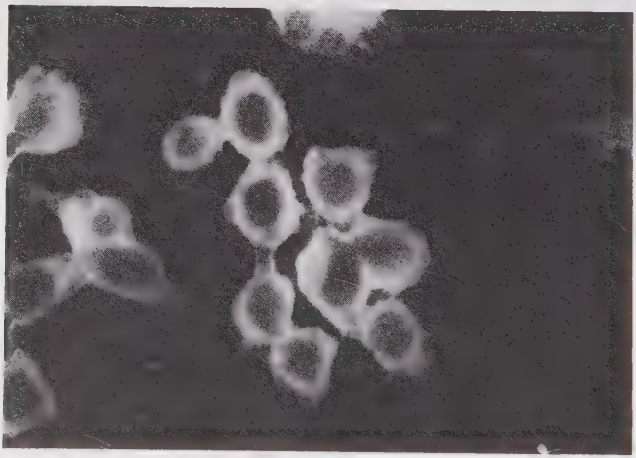
(a)



(b)



(c)



c) CEA-Sezernierung in das Kulturmedium

Bei CEA-spezifischen Zell-Zell-Reaktionen kann freies CEA möglicherweise kompetitiv hemmen. Es mußte daher festgestellt werden, in welchem Ausmaß die Zell-Linien CEA ins Medium freisetzen, da verschiedentlich berichtet worden war, daß auch in vitro gewisse Zell-Linien, die aus menschlichem gastrointestinalem Tumormaterial stammen, CEA sezernieren können (29,46,49,50,51,54,55,56,57,58,59,60). Die ins Kulturmedium freigesetzte Menge an CEA kann auf radioimmunologischem Wege bestimmt werden. Es wurde festgestellt, daß nicht alle der untersuchten Zell-Linien, die aus Tumormaterial von Patienten mit erhöhtem CEA-Spiegel im Serum hervorgehen, auch in Kultur CEA sezernieren. Erst wenn sich die Zellen in der stationären Wachstumsphase befanden, war CEA-Sekretion nachweisbar. Der CEA-Gehalt im Medium stieg dann kontinuierlich an, bis durch Mediumverbrauch und Überwuchern die Zellen absterben. Nach Feststellen dieser Zusammenhänge wurde für einen Vergleichstest das Medium erneuert, nachdem die Zellen die stationäre Wachstumsphase erreicht hatten. Danach wurden die Kulturflaschen mit den Zellen so lange inkubiert, bis die ersten Zellen sich ablösten. Das Medium wurde danach abzentrifugiert, um die toten Zellen zu entfernen. Ein Aliquot des Mediums (1 ml) wurde im radioimmunologischen Test auf den CEA-Gehalt untersucht. Die Resultate sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die beste CEA-Produktion zeigten die Zell-Linien 3,7, 8 A,13,17,20,21 und HT 29.

Weiterhin wurde eine von der Zellpassage abhängige CEA-Sekretion ins Medium im besonderen bei der Zell-Linie HT 29 überprüft. Dabei stellte sich heraus, daß die sezernierte Menge an CEA pro Tag über 20 Passagen im wesentlichen konstant blieb (siehe Tabelle 4). Die Zell-Linie HT 29 war also eine stabile Zell-Linie, die sich für ein langfristiges Untersuchungsprogramm eignete.

Tabelle 4:
Abhängigkeit der CEA-Sekretion in der stationären Wachstumsphase von der Inkubationszeit bei der Zell-Linie HT 29

Inkubationszeit in Tagen	CEA-Gehalt im Medium in ng/ml
1	1,75
2	2,7
7	4,75
13	10,3
15	15,2
24	15,9
36	36,8

Durch p_H-Erhöhung bzw. p_H-Erniedrigung des Mediums mit Hilfe von 20 µl 1 N Natronlauge pro Milliliter Medium bzw. 20 µl 1 N Salzsäure pro Milliliter Medium wurde laut Ellison versucht, die CEA-Sekretion ins Medium zu erhöhen (57). Es konnte jedoch bei den Primärkulturen keine wesentlich erhöhte CEA-Freisetzung beobachtet werden. Bei allen Zell-Linien, die aus Primärkulturen stammten, wurde keine so hohe CEA-Sekretion der Zellen erreicht wie sie bei der permanenten Zell-Linie HT 29 ohnedies schon bei normalem p_H-Wert etabliert war (siehe Tabelle 2).

d) CEA-Gehalt in den Zellen

In Ergänzung zu den vorigen Versuchen wurde auch der CEA-Gehalt in den Zellen bzw. an der Oberfläche der Zellen durch Perchlorsäure-Extraktion der Zellen quantitativ durch eine radioimmunologische Methode bestimmt. Die zu untersuchenden Zellen wurden in Petrischalen (50 cm^2 Wachstumsfläche) 48 Stunden wachsen lassen, dann mit einem Gummischaber abgekratzt - Trypsin könnte CEA an der Zelloberfläche angreifen - und mit PBS^- gewaschen. Die Zelldichte pro Petrischale betrug zwischen 5 x 10^5 und 1 x 10^6 Zellen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert. Dem Zellsediment wurden 2,5 ml Saline und 2,5 ml Perchlorsäure 1,2 molar zugefügt und nach einer 15 minütigen Wartezeit 10 Minuten bei 1 000 x g zentrifugiert. Das neue Sediment wurde verworfen und der Überstand genau so behandelt wie der Überstand von Seren nach der Perchlorsäure-Extraktion (siehe Abschnitt Methoden).

Vorallem bei den Zell-Linien 3,4,7,10,13,14,20,22 und HT 29 konnte CEA in der Zelle nachgewiesen werden.

Eine grobe Zuordnung des Anteils an CEA, der in den Zellen bzw. an der Zelloberfläche vorhanden ist, läßt sich durch Korrelation mit den Intensitäten der CEA-spezifischen Immunfluoreszenz der intakten Zellen erreichen. Im wesentlichen zeigten die Zellen mit dem höchsten CEA-Gehalt auch die stärkste Intensität der Immunfluoreszenz mit Ausnahme der Zell-Linie 8 A. Bei dieser Zell-Linie muß angenommen werden, daß der größte Teil des CEA an der Zelloberfläche gebunden ist, da die Intensität der Immunfluoreszenz vergleichbar war mit den Zell-Linien, die einen 39-fachen (Zell-Linie 3) bzw. einen 70-fachen (Zell-Linie HT 29) CEA-Gehalt aufwiesen.

e) In vivo Passage der zu untersuchenden Zell-Linien in Nacktmäusen

Es wurde versucht, durch eine in vivo Passage von einigen Zell-Linien in thymuslosen Nacktmäusen, eine Selektionierung von Zellen mit einem höheren CEA-Gehalt zu erreichen.

Es wurden Zellen aus verschiedenen Zell-Linien in Konzentrationen von 1×10^6 Zellen pro 0,2 ml gespritzt, die sich in den bisherigen Untersuchungen entweder durch deutliche Immunfluoreszenzfärbung oder durch hohen CEA-Gehalt in der Zelle oder CEA-Sekretion aus der Zelle hervorgehoben hatten (Zell-Linien 3,7,8A,13,17,18,20,22 und HT 29).

Nur die Nacktmäuse, die mit HT-29 Zellen gespritzt worden waren, zeigten nach ungefähr einer Woche Tumorwachstum. Drei Wochen nach der Injektion der Tumorzellen wurde der entwickelte Tumor entfernt und in Kultur genommen. Durch Chromosomenbestimmung wurde bestätigt, daß es sich um menschliche Zellen handelt. Danach wurden die Zellen wieder auf CEA-Gehalt und CEA-Sekretion ins Medium untersucht. Es konnte jedoch keine Erhöhung der CEA-Produktion nach der in vivo Passage festgestellt werden (siehe Tabelle 5)

Tabelle 5:
CEA-Produktion von HT 29-Zellen nach einer in vivo Passage in Nacktmäusen

Zellen dicht seit Tagen	HT 29 Kontrolle CEA-Sekretion in ng/ml	HT 29 aus Nacktmaus CEA-Sekretion in ng/ml
14	10,5	11,65
20	15,1	14,8
22	15,9	15,2

B. Präparation der Effektorzellen

Effektorzellen (=Lymphozyten) sind Zellen des Immunsystems, die die zellvermittelte Immunantwort bewirken. Man kann zwischen mehreren Typen von Lymphozyten unterscheiden, die in vitro zytotoxische Reaktionen hervorrufen, wobei die drei wichtigsten sind (61):

1. Antikörper-unabhängige Zytotoxizität, vermittelt durch spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten (zytotoxische T-Lymphozyten = CTL);

2. Antikörper-abhängige Zytotoxizität (Antibody dependent cellular cytotoxicity = ADCC), vermittelt durch normale Lymphozyten (Killer-Zellen = K-Zellen);

3. Natürliche Zytotoxizität, vermittelt durch Lymphozyten von normalen Spendern, die wissentlich nicht sensibilisiert sind gegen Zielzellen-Antigene (natürliche Killer-Zellen = NK-Zellen).

Bei Lymphozyten-Zytotoxizitätstesten ist also zu berücksichtigen, daß neben spezifisch durch CEA sensibilisierten zytotoxischen Lymphozyten und neben der durch spezifische Anti-CEA-Antikörper vermittelten Zytotoxizität auch die natürliche Zytotoxizität mit nicht definierbarer Spezifität vorhanden ist, die zur Zerstörung von Tumorzellen fähig ist.

Zytotoxische T-Lymphozyten entstehen, wenn sogenannte "kleine" Lymphozyten der T-Linie fremdem zellulärem Antigen ausgesetzt werden (62). Die kleinen Lymphozyten differenzieren sich und vermehren sich. Durch die Proliferation bilden sich hoch zytotoxische große Lymphozyten, die zytotoxischen T-Lymphozyten. Durch den Kontakt mit dem fremden

Antigen werden aus den kleinen T-Lymphozyten auch Memory-Zellen gebildet, die bei späterem Wiederauftreten des fremden Antigens dieses sofort wiedererkennen und durch Vermehrung CTL bilden können. Die Zielzellen-Antigene werden durch spezifische Rezeptoren an der CTL-Oberfläche erkannt, die durch die CTL selbst synthetisiert werden. Das CTL-System besitzt sehr hohe Spezifität. Die CTL zerstören die Zielzellen durch eine nicht phagozytierende Reaktion, die den direkten Kontakt zwischen den Zelltypen erfordert. Zuerst kommt eine reversible Bindung zustande, in der der spezifische Kontakt zwischen den Effektorzellen und den Zielzellen hergestellt wird. Danach erfolgt die irreversible Schädigung der Zielzelle, wobei die CTL nicht zerstört werden, sondern im Gegenteil neue Zielzellen angreifen können (63).

Das wichtigste an der K-Zellen vermittelten zytotoxischen Reaktion ist, daß Antikörper als Erkennungsfaktoren dienen, und erst durch sie nach Bindung an die Oberflächenantigene die Anfangsreaktion der Zytotoxizität zustande kommt (64,65). Die K-Zellen vermittelte Zerstörung der Zielzellen ist eine außerordentlich empfindliche Reaktion. Obwohl die zur Zielzellenlyse führenden Prozeße im CTL-System und im K-Zellen-System fast identisch sind, handelt es sich dabei um verschiedene Lymphozyten (63). Die K-Zelle hat an ihrer Oberfläche sogenannte Fc-Rezeptoren (bzw. C 3 Rezeptoren), die gebundene IgG-Antikörper an ihrem Fc-Teil erkennen können. Der Fc-Rezeptor an den Lymphozyten hat im wesentlichen zwei wichtige Funktionen. Er vermittelt erstens den engen Kontakt zwischen den Zellen, der zur Lyse notwendig ist, und zweitens löst er vermutlich über diesen Kontakt die Zerstörung durch die K-Zelle aus (66).

- ca. 40 % der K-Zellen scheinen aus T-Zellen zu bestehen, da sie spezifische T-Zellen-Marker (wie E^+ und HP^+) aufweisen.
- ca. 40 % der K-Zellen haben keinen T-Zellen-Marker, können jedoch die aktivierte Komplement-Komponente C 3 binden.

- K-Zellen sind keine B-Zellen, das konnte durch Versuche bestätigt werden (67).

Die natürliche zellvermittelte Zytotoxizität wird auf die lytische Aktivität von Lymphozyten (NK-Zellen) aus gesunden, nicht wissentlich immunisierten Spendern zurückgeführt. Mehrere verschiedene Mechanismen sind in der natürlichen Zytotoxizität enthalten. Die meisten NK-Zellen gleichen sehr den K-Zellen. Es wurde jedoch durch Versuche festgestellt, daß die natürliche Zytotoxizität nur zum Teil Antikörper-abhängig ist, wobei die Herkunft der Immunglobuline noch unbekannt ist (68). Ein anderer Teil der NK-Zellen ist Antikörper-unabhängig und auch unspezifisch, die Lymphozyten besitzen zwar einen Fc-Rezeptor für IgG, haben jedoch kein oberflächengebundenes Immunglobulin (69). Es wird vermutet, daß Interferon oder ähnliche Substanzen die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen in unspezifischer Weise steigern können (70). Die natürliche Zytotoxizität ist in den meisten Fällen selektiv, d.h. manche Zielzellen sind empfänglich für die Aktivität von bestimmten Spenderlymphozyten, während es andere nicht sind. Die Reaktionen sind also nur teilweise spezifisch (71).

Experimentelle Durchführung

Die in folgenden Versuchen eingesetzten Effektorzellen wurden aus dem peripheren Blut von Patienten und gesunden Kontrollpersonen isoliert. Es handelte sich dabei um eine gemischte Lymphozytenpopulation.

Zunächst wurden 40 ml Blut steril entnommen und mit Glasperlen defibriniert. Diese Methode zur Verhinderung der Blutgerinnung wurde gewählt, weil dabei die Thrombozyten agglutinieren und bei der Isolierung der Lymphozyten aus dem Blut nicht mehr störend wirken können. Weiter wurde nach Böyum verfahren, der

eine Methode zur Trennung der Lymphozyten von den übrigen Blutzellen beschrieb (72). Dabei wurde das defibrinierte Blut mit dem gleichen Volumen physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und dann auf ein Gemisch aus Natrium-Metrizoat (Isopaque) und Ficoll geschichtet. Ficoll bringt die Erythrozyten zur Agglutination, die somit schnell in der Trennflüssigkeit sedimentieren und Natrium-Metrizoat besitzt eine hohe Dichte, so daß nur die Erythrozyten durchsinken können. Nach 40-minütiger Zentrifugation bei 400 x g und 20°C kann man an der Trennschicht zwischen Blut und Trennflüssigkeit die Lymphozyten abpipettieren. Die meisten anderen Leukozyten befinden sich in der Blutplasmaschicht über den Lymphozyten. Die Lymphozytensuspension wurde danach 2 bis 3 mal in Medium gewaschen und ausgezählt. Mit dieser Methode konnte bei dem relativ großen Blutvolumen eine Lymphozyten-Ausbeute von ca. 50 % erreicht werden. Die Verunreinigung der Zellsuspension durch andere Zellen (hauptsächlich Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten) betrug ungefähr 5 %. Die Lymphozytensuspension wurde in Medium aufgenommen und bei 37°C inkubiert.

C. Lymphozyten-Zytotoxizitätsteste

Die zelluläre Immunantwort auf tumor-assoziierte Antigene auf der Tumorzelloberfläche kann in vitro durch Lymphozyten-Zytotoxizitätsteste untersucht werden. In diesen Testen wird die Fähigkeit der Lymphozyten festgestellt, Zielzellen (Tumorzellen) spezifisch zu zerstören.

Dabei mißt man nicht nur die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und die NK-Zellen, sondern möglicherweise auch Antikörper-abhängige K-Zellen Zytotoxizität, da bei der gewählten Präparationstechnik einerseits anhaftende CEA-spezifische Antikörper aus dem Serum, andererseits die Möglichkeit, daß bestimmte Lymphozyten auch während der Inkubation Antikörper produzieren können, nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

Der von Takasugi und Klein entwickelte Mikrozytotoxizitätstest wird auf kleinen Mikrotestplatten mit 60 Vertiefungen pro Platte und 10 µl Volumen je Vertiefung durchgeführt (73). Der Test geht davon aus, daß die Tumorzellen in den Vertiefungen festwachsen und sich nach Zerstörung durch die Effektorzellen ablösen. Somit kann man durch Waschen der Platten die noch anhaftenden Zellen zählen und mit den Tumorzellen vergleichen, die nur mit Medium oder mit Lymphozyten von Kontrollpersonen inkubiert werden. Da bei dieser Zählmethode auch Zellen gezählt werden, die ohne Zerstörung durch die Effektorzellen ihre Anhaftung verlieren, wurde der Test weiterentwickelt, indem man radioaktiv markierte Substanzen wie ^{3}H-Prolin, ^{125}J-Iododesoxyuridin und $Na_2\ ^{51}CrO_4$ für den Einbau in Zielzellen verwendete (45,74,75). Wichtig für diese Substanzen ist, daß sie schnell eingebaut, aus einer Zelle erst bei genügend großer Schädigung freigesetzt und vorallem nicht erneut von anderen Zellen eingebaut werden können.

1. Vormarkierung der Zielzellen

In den folgenden Lymphozyten-Zytotoxizitätstesten wurden die Zielzellen (Zell-Linie HT 29) ebenfalls nach Bean mit ^{3}H-Prolin vormarkiert (45). Man gab 100 µCi ^{3}H-Prolin (spezifische Aktivität 117 Ci/mmol) zu einer 5 ml Zellsuspension von 1 x 10^{5} Zellen pro Milliliter Medium. Die Zielzellen wurden 3 Tage vor dieser Markierung abtrypsiniert und in Medium ohne Prolin zum Wachsen gebracht, damit das radioaktiv markierte Prolin besser eingebaut werden konnte. Nach 20 bis 24 Stunden Inkubation mit ^{3}H-Prolin wurde das Medium aus der Kulturflasche abgeschüttet und die festgewachsenen Zellen wurden vorsichtig mit Trypsin abgelöst und in 5 ml Medium mit Prolin aufgenommen. Die Zugabe von unmarkiertem Prolin im Medium soll später die Wiederverwendung von schon eingebautem ^{3}H-Prolin verhindern. Diese Zellsuspension wurde in einem sterilen Plastikröhrchen mit einem kleinen Magnetrührer vorsichtig gerührt, so daß sich die Zellen nicht absetzen konnten. Aus dieser Suspension von Zielzellen wurden jeweils 10 µl entnommen und in die Vertiefungen der Mikrotestplatten verteilt. Jede Einzelprobe enthielt dann ca. 500 Zielzellen.

Die vormarkierten Zielzellen wurden zunächst auf ihren ^{3}H-Prolin-Gesamteinbau kontrolliert. Man gab dafür 6 Einzelproben, die zuvor mit SDS behandelt wurden, zu einer Zählprobe zusammen auf ein Filterrondell und zählte sie nach dem Trocknen und der NCS- sowie der Toluol-Szintillatorzugabe im Szintillationszähler aus. Erst wenn pro Gesamtprobe mindestens 15 000 bis 20 000 cpm erreicht waren, wurden diese vormarkierten Zielzellen für den Lymphozyten-Zytotoxizitätstest weiterverwendet.

Waren die Zielzellen in den Vertiefungen der Mikrotestplatten nach 4 bis 6 Stunden festgewachsen, klopfte man das Medium und die nicht festgewachsenen Zellen vorsichtig ab

und gab Lymphozyten im Verhältnis Zielzelle : Lymphozyten wie 1 : 100 dazu. Während dieser Zeitdifferenz waren die Zielzellen noch nicht dicht gewachsen, so daß keine Produktion und Sezernierung von CEA und somit auch keine Blockierung von CEA-Rezeptoren anzunehmen war.

Von den Lymphozyten jeder Testperson wurden mindestens 18 Einzelproben angefertigt, die 3 Zählproben ergaben.

2. Bestimmung der Lymphozyten-Zytotoxizität

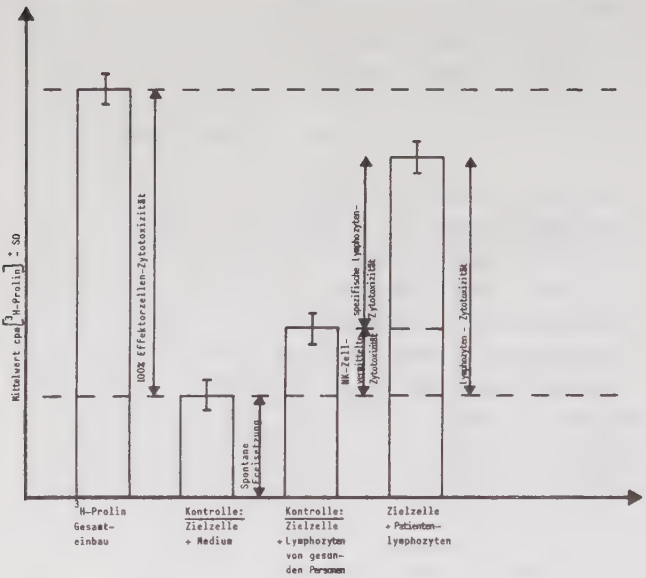
Bei der Zerstörung der Zielzellen durch Lymphozyten im 48-Stunden-Test wurde das radioaktiv markierte Prolin, das von den Zielzellen aufgenommen wurde, wieder ins Medium freigesetzt. Aufgrund des freiwerdenden und des noch in den Zellen befindlichen ^{3}H-Prolins kann der zytotoxische Effekt bestimmt werden. Als Kontrolle diente einmal die Freisetzung von ^{3}H-Prolin aus den Zielzellen, die nur mit Medium inkubiert wurden. Daraus konnte die spontane Abgabe von ^{3}H-Prolin aus den Zellen bzw. die Spontanlyse der Zellen festgestellt werden. Außerdem wurde die Freisetzung der radioaktiv markierten Aminosäure aus Zielzellen, die mit Lymphozyten aus gesunden Testpersonen inkubiert wurden, als Kontrolle für NK-vermittelte Zytotoxizität herangezogen. Durch diese beiden Kontrollwerte läßt sich eine mögliche CEA-spezifische Zytotoxizität der Patientenlymphozyten aufzeigen.

In Abbildung 3 ist der Zusammenhang der einzelnen Meß- und Rechnungsgrößen im einzelnen dargestellt. Die Lymphozyten-Zytotoxizität wurde berechnet wie folgt:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \frac{(\text{gemessene Freisetzung von } ^{3}\text{H-Prolin}) - (\text{spontane Freisetzung von } ^{3}\text{H-Prolin})}{(^{3}\text{H-Prolin-Gesamteinbau}) - (\text{spontane Freisetzung von } ^{3}\text{H-Prolin})} \times 100$$

Abbildung 3:

Zusammenhang der Meß- und Rechnungsgrößen zur Bestimmung der Lymphozyten-Zytotoxizität



Es wurde sowohl die Freisetzung des Isotops aus den zerstörten Zielzellen im Medium der Proben gemessen, als auch die Radioaktivität der überlebenden Zielzellen. Hierzu wurden die noch anhaftenden Zellen mit einer 1 %-igen SDS-Lösung lysiert und die noch eingebaute Aktivität bestimmt. Diese "Restaktivität" war eine zusätzliche Kontrolle für den Test, da bei hoher freigesetzter Aktivität im Medium die Restaktivität klein sein mußte und umgekehrt. Somit konnte festgestellt werden, ob die Zielzellenzahl in den einzelnen Proben übereinstimmte. Die Summe der Radioaktivität aus den beiden Fraktionen entsprach ziemlich gut dem ^{3}H-Prolin-Gesamteinbau, der durch Lyse der Zielzellen-Kontrollen mit SDS bestimmt wurde.

Die gemessene Lymphozyten-Zytotoxizität ist im wesentlichen auf spezifische CTL und NK-Zytotoxizität zurückzuführen. Man muß jedoch in Betracht ziehen, daß die spezifische Lymphozyten-Zytotoxizität nicht nur durch CTL, sondern zu einem Teil auch durch ADCC bewirkt werden kann, wenn z.B. bei der Lymphozyten-Isolierung vom Patienten spezifische Antikörper auf den K-Zellen haften bleiben oder spezifische Antikörper während der Inkubation mit der Zielzelle durch entsprechende Lymphozyten neu gebildet werden.

3. Lymphozyten-Zytotoxizität bei Patienten und gesunden Personen

In Zusammenarbeit mit der chirurgischen Klinik Stuttgart-Bad Cannstatt wurde Blut von Patienten mit malignen Tumoren des Magen-Darm-Traktes entnommen und nach der in Abschnitt II B beschriebenen Weise Lymphozyten isoliert. Die Patienten wurden entweder stationär vor oder nach einer Operation in der Klinik behandelt, oder sie kamen ambulant zu einer Nachsorgeuntersuchung. Bei diesen Untersuchungen wurde unter anderem der CEA-Gehalt im Blut der Patienten bestimmt, um durch den Verlauf der CEA-Kurven frühzeitige Prognosen hinsichtlich eines Rezidivs zu erhalten (76).

Bei jeder Blutentnahme von Patienten für die Lymphozyten-Zytotoxizitätsteste wurde auch von gesunden Personen bzw. Personen ohne Karzinom-Erkrankungen Blut abgenommen.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Lymphozyten-Zytotoxizitätsteste gegenüber der Zielzelle HT 29 zusammen mit den CEA-Werten für freies und komplexgebundenes CEA für jeden einzelnen Patienten und für die Kontrollpersonen aufgeführt. Die obere Grenze des Normalbereichs für freies CEA ist 2,0 ng/ml Serum, die Signifikanzgrenze für CEA, das in Immunkomplexen gebunden ist, liegt bei 3,5 ng/ml Serum.

Tabelle 6:

Lymphozyten-Zytotoxizität bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Testperson	Primär-karzinom	Alter	Tage nach der 1. Operation	% Zytotoxi-zität	CEA-Ge-halt des Serums ng/ml	CEA-Immun-komplexe ng/ml
Patient 1	Rektum-	56	716	70 % **	3,5	< 3,5
Patient 2	Rektum-	57	796	22 % ***	7,1	-
Patient 3	Rektum-	72	1 216	21 % ***	< 2,0	-
Patient 4	Kolon-	74	3	23 % ***	12,9	-
Patient 5	Sigma-	43	5	18 % ***	4,9	-
Patient 6		52	präop.	14 % ***	2,2	-
Patient 7	Magen-	40	1	20 % ***	6,1	-
Patient 8	Magen-	71	18	17 % ***	4,9	-
Patient 9	Kolon-	68	10	60 % ***	2,1	< 3,5
Patient 10	Magen-	64	1 153 (5 nach 2. Operation)	91 % **	< 2,0	-
			1 224 (71 nach 2. Operation)	22 % ***	4,4	3,6
Patient 11	Rektum-	73	1 317 (890 nach 2. Operation)	64 % ***	16,3	9,6
			1 349 (922 nach 2. Operation)	31 % ***	15,4	< 3,5

Fortsetzung von Tabelle 6:

Testperson	Primär-karzinom	Alter	Tage nach der 1. Operation	% Zytotoxizität	CEA-Gehalt des Serums ng/ml	CEA-Immunkomplexe ng/ml
Patient 12	Rektum-	43	11	77 % **	-	-
			30	40 % ***	<2,0	<3,5
			58	73 % ***	2,7	<3,5
Patient 13	Rektum-	41	38	46 % ***	4,5	<3,5
			68	28 % ***	2,4	<3,5
			117	39 % ***	<2,0	<3,5
Patient 14	Sigma-	72	1 012	80 % **	8,7	<3,5
			1 039	44 % ***	6,7	-
Patient 15	Kolon-	66	404	16 % ***	24,5	-
			431 (8 nach 2. Operation)	51 % ***	6,9	<3,5
Kontroll-personen:						
1	-	21	-	23 % ***	<2,0	-
2	-	40	-	10 % ***	<2,0	-
3	-	25	-	18 % ***	<2,0	-
4	-	50	-	32 % ***	<2,0	-
5	-	28	-	36 % ***	<2,0	-
6	-	45	-	22 % ***	<2,0	-

Fortsetzung von Tabelle 6:

Testperson	Primär-karzinom	Alter	Tage nach der 1. Operation	% Zytotoxizität	CEA-Gehalt des Serums ng/ml	CEA-Immunkomplexe ng/ml
Kontroll-personen:						
7	-	50	-	13 % ***	< 2,0	-
8	-	25	-	23 % ***	< 2,0	-
9	-	22	-	7 % ***	< 2,0	-
10	-	55	-	3 % ***	< 2,0	-
11	-	48	-	5 % ***	< 2,0	-
12	-	22	-	17 % ***	2,5	-
13	-	50	-	29 % ***	< 2,0	-

Die Signifikanzgrenzen liegen bei *** = $P < 0,001$
** = $P < 0,01$
* = $P < 0,05$

Die Signifikanz der Zytotoxizitätswerte wurde - bezogen auf den ^{3}H-Prolin-Gesamteinbau - nach dem Student-T-Test bestimmt.

Die Zytotoxizitätswerte der Patienten 1 und 9 - 15 liegen deutlich über den Zytotoxizitätswerten, die bei 13 Kontrollpersonen ermittelt wurden. Die überhöhte Lymphozyten-Zytotoxizität ist weder abhängig vom Alter, noch von der Charakterisierung des Primärkarzinoms.

Bei den Patienten, bei denen nach der Operation nach verschiedenen Zeiten die Lymphozyten-Zytotoxizität bestimmt wurde, kann man ein Absinken, ein Ansteigen oder einen Wiederanstieg der Lymphozyten-Zytotoxizität feststellen. Der Beobachtungszeitraum ist jedoch nicht ausreichend, um eine eindeutige Korrelierung mit dem klinischen Verlauf der Krankheit herzustellen.

Die Kriterien des durchgeführten Lymphozyten-Zytotoxizitätstestes geben keine Aussage darüber, inwieweit die Zytotoxizität spezifisch gegen CEA auf der Oberfläche der HT 29-Zielzelle gerichtet war. Dies muß in weiteren Testen z.B. durch spezifische Hemmung der Zytotoxizität untersucht werden.

4. Stimulationskontrollen mit Phytohämagglutinin

Nach den Vorbereitungen zu dem Lymphozyten-Zytotoxizitätstest wurden die Lymphozyten zur Kontrolle ihrer Lebensfähigkeit in einigen ausgewählten Fällen mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. In diesem Stimulationstest wurde die Fähigkeit der Zellen zum erhöhten ^{3}H-Thymidin-Einbau bei Anwesenheit von PHA gemessen, d.h. die Transformierbarkeit der Lymphozyten in DNS-synthetisierende Lymphoblasten. In der Tabelle 7 sind die Stimulationsergebnisse mit der Lymphozyten-Zytotoxizität bei einigen Testpersonen aufgeführt.

Die Ergebnisse sind in counts per minute (cpm) $\pm$ Standardabweichung (SD) angegeben. Der Stimulationsindex (SI) wurde berechnet aus:

$$SI = \frac{\text{Mittelwert cpm von Lymphozyten + PHA}}{\text{Mittelwert cpm von Lymphozyten + nur Medium}}$$

Tabelle 7:

Stimulationskontrollen mit PHA

Testperson	Primär-karzinom	HT 29 Zyto-toxizität	Stimulation mit PHA		SI
			Dosis in g/Probe	^{3}H-Thymidin-Einbau in cpm ± SD	
Kontroll-person 1	-	18 %	-	3 041 ± 1 738	
			2,5	97 495 ± 20 431	32
			10	136 145 ± 53 441	45
Kontroll-person 2	-	23 %	-	2 265 ± 115	
			2,5	229 670 ± 58 347	101
			10	403 875 ± 27 654	178
Kontroll-person 3	-	29 %	-	8 494 ± 6 717	
			2,5	491 360 ± 36 792	58
			10	459 556 ± 108 212	54
Patient 1	Magen-	22 %	-	1 510 ± 1 054	
			2,5	88 970 ± 7 306	59
			10	76 002 ± 10 414	50
Patient 2	Rektum-	22 %	-	1 091 ± 1 383	
			2,5	325 095 ± 45 282	298
			10	303 066 ± 84 082	278
Patient 3	Rektum-	64 %	-	8 174 ± 759	
			10	262 021 ± 50 394	32
Patient 4	präop.	14 %	-	216 ± 44	
			10	63 361 ± 26 282	293
Patient 5	Magen-	20 %	-	130 ± 47	
			10	37 986 ± 7 130	292

Fortsetzung von Tabelle 7:

Testperson	Primär-karzinom	HT 29 Zyto-toxizität	Dosis in g/Probe	^{3}H-Thymidin-Einbau in cpm ± SD	
Patient 6	Rektum-	77 %	-	27 ± 1	
			10	17 339 ± 456	642
Patient 7	Sigma-	80 %	-	14 ± 4	
			10	39 878 ± 16 641	2 848
Patient 8	Rektum-	73 %	-	500 ± 454	
			10	27 382 ± 2 336	55
Patient 9	Rektum-	39 %	-	1 665 ± 1 168	
			10	90 310 ± 13 734	54
Patient 10	Kolon-	39 %	-	123 ± 57	
			10	10 831 ± 241	88

D. Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität durch CEA-Immunkomplexe

Mehrere Versuche haben gezeigt, daß Seren von Patienten in der Lage sind, die Lymphozyten-Zytotoxizität gegen Tumorzellen in vitro zu hemmen (4,11,13,77,78,79). Es wird analog dazu angenommen, daß diese Blockierung auch in vivo besteht und so Tumorwachstum trotz vorhandener zellulärer Immunität stattfinden kann (5). Zunächst glaubte man, daß freies Antigen sich mit den Lymphozyten-Rezeptoren verbindet, und die Lymphozyten somit ihre Reaktivität gegen die Tumorzellen verlieren (5,11,13). Es ist auch möglich, durch Tumorzell-Extrakte, die lösliches Antigen enthalten, eine Hemmung der zytotoxischen Reaktion zu erreichen (10,12,80). Weiter wurde von Hellström gefunden, daß es sich bei der Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität durch Patientenseren auch um Antikörper handeln könnte, die mit der Tumorzelloberfläche reagieren (5). Als man danach jedoch feststellte, daß nach Tumorentfernung die blockierende Wirkung des Serums auf die Zielzellen-Zerstörung durch Immunlymphozyten aufgehoben wurde, schien es wahrscheinlich zu sein, daß diese hemmenden Faktoren direkt mit dem Tumor zusammenhängen. Daraus wurde dann von Hellström abgeleitet, daß viele zirkulierende Hemmfaktoren Komplexe zwischen Tumorantigenen und ihren Antikörpern darstellen (8,9). Diese Komplexe können sich sowohl an die Zielzellen, als auch an die Effektorzellen binden.

CEA-Immunkoplexe sind in Seren von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren nachgewiesen worden (32,33). CEA-Immunkomplexe können neben freiem CEA in Seren mit einem radioimmunologischen Test bestimmt werden. In diesem Test kann nach Perchlorsäure-Fällung der Vollseren der Gehalt an freiem CEA aus dem Überstand, das komplex-gebundene CEA aus dem Sediment der Fällung durch Dissoziation bei hohem

p_H-Wert und hoher Salzkonzentration bestimmt werden (81).

In der schematischen Darstellung Abbildung 4 ist aufgezeigt, wie eine Hemmung bei der CTL durch Antigen oder freien Antikörper und bei der K-Zellen-Zytotoxizität (ADCC) durch Immunkoplexe bewirkt werden kann. Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß bei hohen Verdünnungen die Immunkomplexe parziell in freies Antigen und freien Antikörper dissoziiert sind.

In den folgenden Versuchen wurde die Hemmbarkeit der Lymphozyten-Zytotoxizität durch Seren von Patienten überprüft. Es wurden 2 Seren ausgewählt, die sowohl freies CEA als auch CEA-Immunkomplexe enthielten (siehe Tabelle 8).

Bei den beiden Seren, die zu den Hemmtesten herangezogen wurden, ergaben sich folgende CEA-Konzentrationen:
Serum 1 enthielt 3,7 ng freies CEA/ml und 4,2 ng komplexgebundenes CEA/ml Serum; dieses Serum stammte von Patient 2;
Serum 2 enthielt 16,3 ng freies CEA/ml und 9,6 ng komplexgebundenes CEA/ml Serum;

Die Lymphozyten von 6 Patienten und einer Kontrollperson (1×10^6 Lymphozyten in 0,1 ml Medium) wurden mit je 0,1 ml der beiden sterilen Patientenseren für 24 Stunden vorinkubiert. Danach wurde, wie in Abschnitt II C 2 beschrieben, die zytotoxische Wirkung der Lymphozyten auf die Zielzellen HT 29 untersucht und ihre Hemmung durch die Patientenseren ermittelt. Im Schaubild der Abbildung 5 ist die Auswertung der Lymphozyten-Zytotoxizität zusammen mit der Auswertung der Hemmung einander gegenübergestellt.

Die Lymphozyten-Zytotoxizität wurde analog Abschnitt II C 2 bestimmt. Die Hemmungsrate wurde ermittelt nach:

$$\% \text{ Hemmung der Zytotoxizität} = \frac{(\text{Lymphozyten-Zytotoxizität}) - (\text{Lymphozyten-Zytotoxizität mit Testfraktionen})}{(\text{Lymphozyten-Zytotoxizität})} \times 100$$

Abbildung 5:
Zusammenhang der Meß- und Rechnungsgrößen zur Bestimmung der Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität

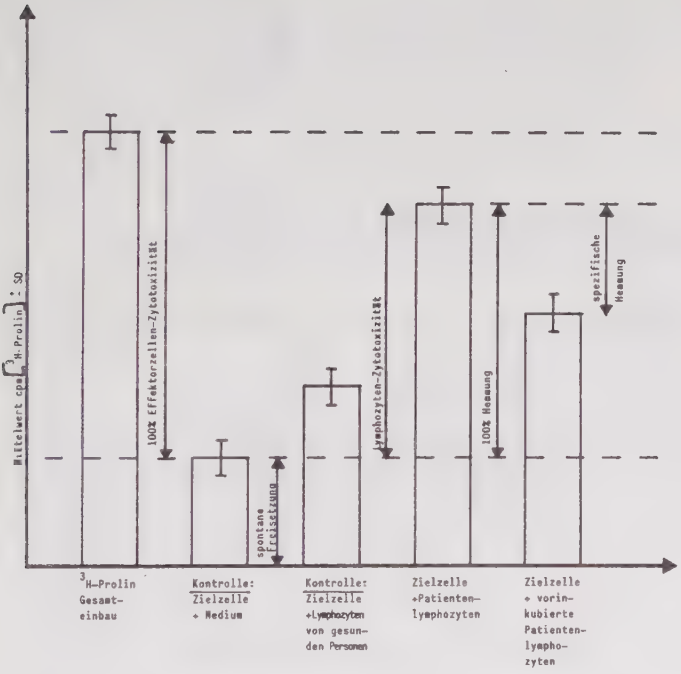
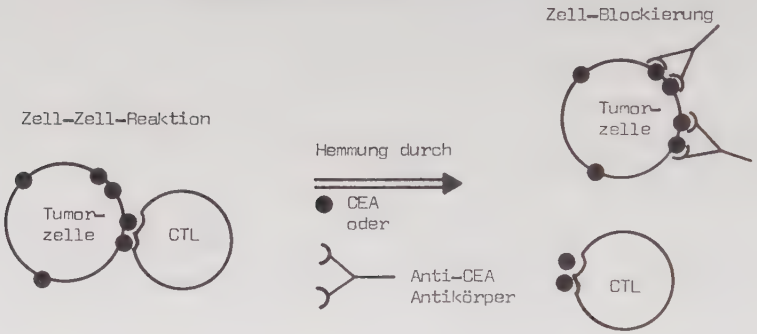
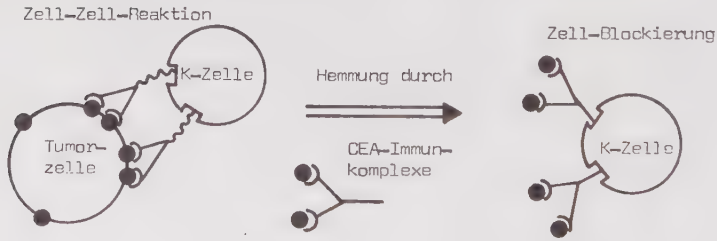


Abbildung 4:
Spezifität der zytotoxischen Reaktionen

Antikörper-unabhängige Zytotoxizität, vermittelt durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL)



Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC), vermittelt durch K-Zellen über den Fc-Teil des spezifischen Antikörpers



Natürliche Zytotoxizität, vermittelt durch NK-Zellen,

wird durch Zellen mit verschiedenen Mechanismen bewirkt, sie ist nicht hemmbar durch CEA-Immunkomplexe, Anti-CEA-Antikörper oder CEA

Die Untersuchungsergebnisse der Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität durch Patientenseren sind in Tabelle 8 zusammengefaßt. Die Signifikanz der Zytotoxizität wurde bezogen auf den ^{3}H-Prolin-Gesamteinbau und nach dem Student-T-Test bestimmt. Die Signifikanz der Hemmungswerte, d.h. die Wahrscheinlichkeit, daß sich die Mittelwerte der Lymphozyten-Zytotoxizität und der Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität unterscheiden, wurde ebenfalls im T-Test nach Student berechnet.

Bei allen Patienten ist ein signifikanter Rückgang der Lymphozyten-Zytotoxizität festzustellen, wenn die Lymphozyten mit den beiden Patientenseren vorinkubiert waren, während bei der gesunden Kontrollperson keine signifikante Hemmung der Zytotoxizität beobachtet wurde. In den Fällen, in denen beide Seren getestet wurden, zeigte dasjenige Serum mit dem höheren Gehalt an CEA-Immunkomplexen fast immer den stärkeren Hemmeffekt.

Weitere Charakterisierung der Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität

Nachdem die Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität durch Patientenseren aufgezeigt werden konnte, wurde versucht, die Seren durch Gelfiltration aufzutrennen, um die komplex-gebundene CEA-Fraktion ohne das freie CEA für weitere Hemmversuche zu verwenden (81). Gleichzeitig wurden die entsprechenden Kontrollversuche mit Seren gesunder Personen durchgeführt. Ein Beispiel für die Auftrennungsdiagramme, die bei der Gelfiltration mit Sephadex G 200-Säulen erhalten wurden, ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Die Fraktion der CEA-Immunkomplexe wurde nach den Vorschriften von Kapsopoulou gewonnen (81). Nach Konzentrierung standen für die weiteren Hemmversuche 5 Proben mit CEA-Immunkomplexen zur Verfügung,

wobei CEA-IC 1 ca. 3,6 ng/ml Serum
CEA-IC 2 ca. 4,8 ng/ml Serum
CEA-IC 3 ca. 5,3 ng/ml Serum
CEA-IC 4 ca. 5,8 ng/ml Serum
CEA-IC 5 ca. 7,2 ng/ml Serum als Immunkomplex gebunden enthielten.

Die genaue Dosierung der Immunkomplex-Mengen war meistens sehr schwierig, da in den entsprechenden Fraktionen die Immunkomplexe zum Teil aus der Lösung ausgefallen waren, insbesondere bei längerem Stehen bei 4° C. Als Kontrolle wurde eine entsprechende Fraktion von normalem menschlichem Serum benützt.

Die Hemmung durch freies CEA wurde in einer Konzentration von 35 µg/ml mit den Lymphozyten der Testpersonen ausgetestet. Ferner wurde exogenes CEA im Gemisch mit CEA-Immunkomplexen im Test eingesetzt, um eine mögliche Dissoziation der Immunkomplexe durch Antigen-Überschuß zurückzudrängen.

Die Verwendung von CEA-Immunkomplex-Fraktionen aus Patientenseren hatte den Nachteil, daß diese Fraktionen möglicherweise andere Komponenten enthielten, die eine Lymphozyten-Zytotoxizität beeinflußen konnten. Zum Nachweis der CEA-Spezifität der Hemmung durch die CEA-Immunkomplex-Fraktionen wurden Parallelversuche mit heterologen CEA-Immunkomplexen durchgeführt. Hierzu wurde CEA und Anti-CEA-Ziegenserum gemischt. Das Anti-CEA-Ziegenserum wurde zuvor mit menschlichen Lymphozyten (aus Buffy Coat) absorbiert, um die natürliche Zytotoxizität gegen menschliche Zellen aus dem Ziegenserum zu entfernen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Die Signifikanz der Hemmung durch CEA-Immunkomplexe wurde nach dem Student-T-Test bestimmt, wobei *** $P < 0{,}001$; ** $P < 0{,}01$; * $P < 0{,}05$; NS = nicht signifikant bedeutet.

Tabelle 8:

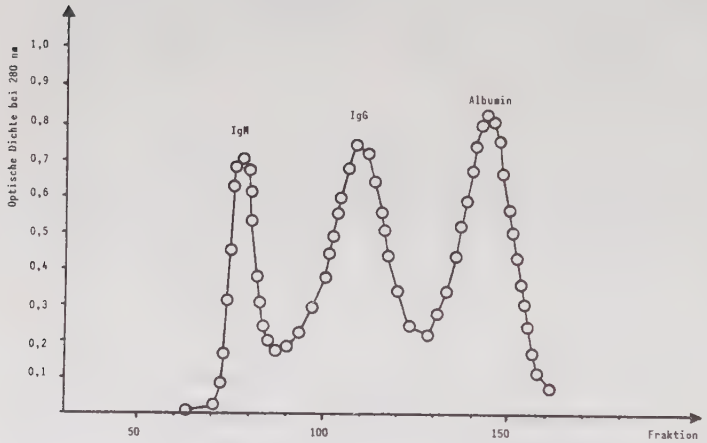
Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität durch Patientenserum

Testperson	Primärkarzinom	Alter	% Zytotoxizität	Lymphozyten vorinkubiert mit	Hemmung der Zytotoxizität	CEA-Gehalt im Serum in ng/ml
Patient 1 (21 Tage nach 1. Operation)	Rektum-	67	48 % 20 % 25 %	- Serum 1 Serum 2	- 59 % ** 49 % *	14,0
Patient 2 (34 Tage nach 1. Operation)	Rektum-	43	40 % 39 % 9 %	- Serum 1 Serum 2	- NS 77 % ***	< 2,0
Patient 3 (3 Tage nach 1. Operation)	Sigma-	60	56 % 36 % 28 %	- Serum 1 Serum 2	- 35 % * 50 % **	< 2,0
Patient 4 (1027 Tage nach 1., 7 Tage nach 2. Operation)	Sigma-	72	44 % 14 % 4 %	- Serum 1 Serum 2	- 68 % ** 91 % ***	8,7
Patient 5 (438 Tage nach 1., 15 Tage nach 2. Operation)	Kolon-	66	51 % 14 %	- Serum 2	- 72 % ***	6,9
Patient 6 (77 Tage nach 1. Operation)	Rektum-	41	28 % 10 %	- Serum 2	- 44 % **	2,4
Kontrollperson	-	22	17 % 25 % 11 %	- Serum 1 Serum 2	- NS NS	< 2,0

Signifikanzgrenzen: *** P< 0,001; ** P< 0,01; * P< 0,05; NS = nicht signifikant;

Abbildung 6:
Beispiele für Auftrennungsdiagramme von (a) Seren von gesunden Personen und (b) Patientenseren über Sephadex G 200-Säulen p_H 7,2

(a)



(b)

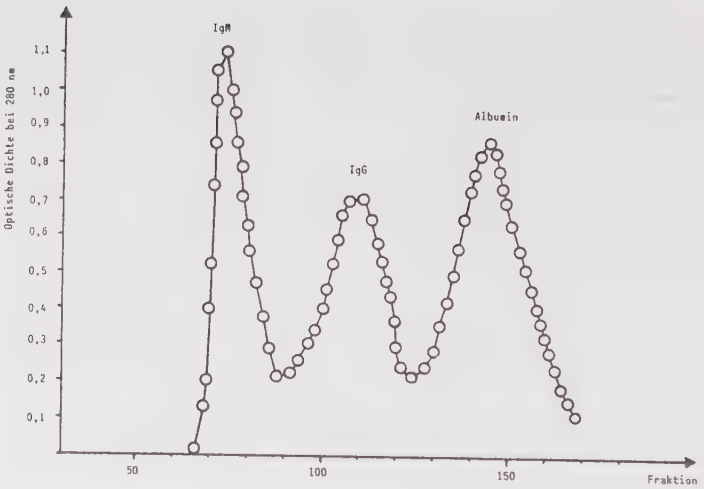


Tabelle 9:

Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität von Patienten durch CEA-Immunkomplex-Fraktionen aus Patientenseren (CEA-IC) bezogen auf die Immunkomplex-Fraktionen von gesunden Kontrollpersonen (IC-Fraktion von Normalserum)

Testperson	Primärkarzinom	Alter	% Zytotoxizität	Lymphozyten vorinkubiert mit	Hemmung der Zytotoxizität	CEA-Gehalt im Serum in ng/ml
Patient 1 (88 Tage nach der Operation)	Rektum-	43	73 % *	-	-	2,7
			72 % **	IC-Fraktion von Normalserum	-	
			52 % **	CEA-IC 1	29 % *	
			41 % **	CEA-IC 4	44 % ***	
			35 % ***	CEA-IC 4 + CEA (1:1)	52 % **	
			52 % *	CEA	NS	
			47 % ***	Anti-CEA-Ziegenserum	36 % **	
			45 % **	Anti-CEA-Ziegenserum + CEA	38 % **	
Patient 2 (119 Tage nach der Operation)	Rektum-	41	59 % **	-	-	< 2,0
			47 % ***	IC-Fraktion von Normalserum	-	
			45 % ***	CEA-IC 1	NS	
			64 % **	CEA-IC 4	-	
			38 % ***	CEA-IC 4 + CEA (1:1)	NS	
			40 % ***	CEA	NS	
			39 % ***	Anti-CEA-Ziegenserum	NS	
			40 % ***	Anti-CEA-Ziegenserum + CEA	NS	

Fortsetzung von Tabelle 9:

Testperson	Primär karzinom	Alter	% Zytotoxizität	Lymphozyten vorinkubiert mit	Hemmung der Zytotoxizität	CEA-Gehalt im Serum in ng/ml
Patient 3 (46 Tage nach der Operation)	Kolon-	67	39 % ***	-	-	<2,0
			49 % ***	IC-Fraktion von Normalserum	-	
			45 % ***	CEA-IC 1	NS	
			50 % ***	CEA-IC 4	-	
			36 % ***	CEA-IC 4 + CEA (1:1)	NS	
			52 % ***	CEA	-	
			54 % ***	Anti-CEA-Ziegenserum	-	
			62 % **	Anti-CEA-Ziegenserum + CEA	-	
Patient 4 (1176 Tage nach der Operation)	Kolon-	61	54 % ***	-	-	<2,0
			49 % ***	IC-Fraktion von Normalserum	-	
			42 % ***	CEA-IC 1	NS	
			65 % ***	CEA-IC 4	-	
			44 % ***	CEA-IC 4 + CEA (1:1)	NS	
			41 % ***	CEA	NS	
			43 % ***	Anti-CEA-Ziegenserum	NS	
			60 % ***	Anti-CEA-Ziegenserum + CEA	NS	

Fortsetzung von Tabelle 9:

Testperson	Primär-karzinom	Alter	% Zytoto-xizität	Lymphozyten vorinkubiert mit	Hemmung der Zytotoxi-zität	CEA-Ge-halt im Serum in ng/ml
Patient 5 (20 Tage nach der Operation)	Magen-	58	71 % ***	-	-	< 2,0
			77 % **	IC-Fraktion von Normal-serum	-	
			70 % ***	CEA-IC 3	NS	
			65 % ***	CEA-IC 3 + CEA (1:1)	NS	
			58 % ***	CEA	25 % **	
Patient 6 (21 Tage nach der Operation)	Rektum	65	76 % ***	-	-	4,3
			72 % **	IC-Fraktion von Normal-serum	-	
			44 % ***	CEA-IC 3	39 % **	
			59 % **	CEA-IC 3 + CEA (1:1)	19 % *	
			60 % ***	CEA	17 % **	
Patient 7	präop.	62	40 % ***	-	-	< 2,0
			27 % ***	IC-Fraktion von Normal-serum	-	
			45 %	CEA-IC 3	-	
			10 %	CEA-IC 3 + CEA (1:1)	63 % *	
			38 %	CEA	-	
Patient 8	präop.	72	41 % ***	-	-	3,5
			40 % ***	IC-Fraktion von Normal-serum	-	
			33 % ***	CEA-IC 3	NS	
			23 % ***	CEA-IC 3 + CEA (1:1)	42 % **	
			34 % ***	CEA	15 % **	

Fortsetzung von Tabelle 9:

Testperson	Primär-karzinom	Alter	% Zytoto-xizität	Lymphozyten vorinkubiert mit	Hemmung der Zytotoxi-zität	CEA-Ge-halt im Serum in ng/ml
Kontroll-person 1	-	50	10 % ***	-	-	< 2,0
			0 % ***	IC-Fraktion von Normal-serum	-	
			0 % ***	CEA-IC 1	NS	
			7 % ***	CEA-IC 4	-	
			0 % ***	CEA-IC 4 + CEA (1:1)	NS	
			0 % ***	CEA	NS	
			5 % ***	Anti-CEA-Ziegenserum	-	
			0 % ***	Anti-CEA-Ziegenserum + CEA	NS	
Kontroll-person 2	-	20	39 % ***	-	-	< 2,0
			41 % ***	IC-Fraktion von Normal-serum	-	
			39 % ***	CEA-IC 3	NS	
			42 % ***	CEA-IC 3 + CEA (1:1)	-	
			36 % ***	CEA	11 % *	
Kontroll-person 3	-	60	20 % ***	-	-	< 2,0
			21 % ***	IC-Fraktion von Normal-serum	-	
			12 % ***	CEA-IC 3	NS	
			23 % ***	CEA-IC 3 + CEA (1:1)	-	
			26 % ***	CEA	-	

Fortsetzung von Tabelle 9:

Testperson	Primär-karzinom	Alter	% Zytoto-xizität	Lymphozyten vorinkubiert mit	Hemmung der Zytotoxi-zität	CEA-Ge-halt im Serum in ng/ml
Kontroll-person 4	-	32	13 % ***	-	-	< 2,0
			10 % ***	IC-Fraktion von Normal-serum	-	
			22 % ***	CEA-IC 2	-	
			15 % ***	CEA-IC 5	-	
			28 % ***	CEA-IC 2 + CEA (1:1)	-	
			12 % ***	CEA-IC 5 + CEA (1:1)	-	
			26 % ***	Anti-CEA-Ziegenserum + CEA	-	

Die Patienten 2,3,4 zeigten keine signifikante Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität, gleich welche Hemmfraktion eingesetzt wurde. Allerdings überschreitet der Zytotoxizitäts-Wert bei diesen Patienten kaum die 50 %-Grenze. Bei den Patienten 1,6,7 und 8 konnte die Lymphozyten-Zytotoxizität durch CEA-Immunkomplexe signifikant gehemmt werden, besonders eindeutig sind die Ergebnisse, wenn der Lymphozyten-Zytotoxizitäts-Wert über 70 % liegt. In diesem Fall ist die CEA-Spezifität der Zytotoxizität (Patient 1) deutlich belegt, da auch der heterologe CEA-Immunkomplex einen vergleichbaren Hemmeffekt zeigt. Bei Patient 5 wurde nur eine Hemmung mit freiem CEA festgestellt.

Die Patienten mit CEA-spezifischer Lymphozyten-Zytotoxizität hatten nur teilweise pathologisch erhöhte Konzentrationen an freiem CEA, so daß auf keinen direkten Zusammenhang der beiden CEA-Kriterien geschlossen werden kann.

Alle vier Kontrollpersonen zeigten den normalen Zytotoxizitäts-Wert, der durch keine der Hemmfraktionen signifikant beeinflußt werden konnte.

Eine exakte Interpretation der Hemmwerte für die CEA-spezifische Lymphozyten-Zytotoxizität ist durch zwei wesentliche Faktoren eingeschränkt:

1. Bei den CEA-Immunkomplexen in Lösung muß grundsätzlich ein Gleichgewicht zwischen Komplex, freiem Antigen und freiem Antikörper angenommen werden, so daß der gemessene Hemmwert möglicherweise auf CTL wie auch K-Zellen-Zytotoxizität bezogen werden muß. Zum anderen ist wahrscheinlich, daß der Immunkomplex eine kritische Vernetzungsgröße für eine wirksame Hemmung haben muß, die durch Zufügen von freiem CEA parziell verändert werden kann.

2. Die präzise Dosierung der Immunkomplexe ist schwierig, da fast alle Immunkomplex-Lösungen teilweise Immunkomplex-Präzipitate hatten, deren Abtrennen vielfach zum Verlust der Hemmaktivität führte.

E. Patientenüberwachung durch CEA-spezifische Lymphozyten-Zytotoxizität

Die bisher besprochene CEA-spezifische Lymphozyten-Zytotoxizität bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren ist nur für einmalige Blutentnahmen belegt worden. Mit der Überwachung von Patienten sollte festgestellt werden, inwieweit man den Verlauf der Lymphozyten-Zytotoxizität gegen HT 29-Zellen mit dem klinischen Verlauf korrelieren kann, insbesondere, ob nach einer kurativen Operation eines Patienten ohne erneute Tumorbildung eine andere Lymphozyten-Zytotoxizität zu beobachten ist wie bei einer lokalen Rezidivbildung oder Metastasierung.

Die CEA-Spezifität der Zytotoxizitäts-Teste kann durch Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität nachgewiesen werden und zwar vorallem dadurch, daß es möglich ist, mit heterologem Immunkomplex aus freiem CEA und Anti-CEA-Ziegenserum zu hemmen.

In dieses Überwachungsprogramm wurden bisher erst 5 Patienten aufgenommen, die kurz nach einer kurativen Operation auf ihre Lymphozyten-Zytotoxizität untersucht wurden und anschließend nochmals nach 3 bis 6 Wochen. Der Begriff kurative Operation bedeutet, daß nach den chirurgischen Kriterien die gesamte Tumormasse entfernt worden war. Kurz nach der Operation konnte man nur bei 2 Patienten eine relativ geringe Zytotoxizität ihrer Lymphozyten gegen HT 29-Zellen feststellen, die durch Immunkomplex-Fraktionen und freies CEA in beiden Fällen nicht signifikant gehemmt werden konnte. 17 bzw. 21 Tage postoperativ war die Lymphozyten-Zytotoxizität der beiden Patienten wesentlich erhöht und konnte vorallem durch alle Immunkomplex-Fraktionen und freies CEA signifikant gehemmt werden. Bei den anderen 3 Patienten blieb die Lymphozyten-Zytotoxizität gegen HT 29-Zellen immer im Normalbereich.

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Patientenüberwachung durch CEA-spezifische Lymphozyten-Zytotoxizitäts-Teste bei 5 Patienten dargestellt. Tabelle 11 zeigt die Zusammenstellung der Kontrollen der Lymphozyten-Zytotoxizität nach mehrmaliger Blutentnahme bei 3 Kontrollpersonen.

Von den 5 Patienten haben bisher nur 2 Patienten eine CEA-spezifische Lymphozyten-Zytotoxizität gegen HT 29-Zellen entwickelt. In beiden Fällen war sie jedoch kurz nach der Operation noch nicht nachweisbar, was möglicherweise auf eine Operationsstress-induzierte Immunsuppression zurückzuführen ist (92). Bei beiden Patienten wird die CEA-spezifische Lymphozyten-Zytotoxizität 2 - 3 Wochen nach der Operation signifikant. Gleichzeitig konnte ein Anstieg der Konzentration an freiem CEA im Serum festgestellt werden.

Die anderen 3 der 5 überwachten Patienten hatten während des Überwachungszeitraumes Zytotoxizitäts-Werte nur im Normalbereich und zeigten keine Anhaltspunkte für eine CEA-Spezifität der zytotoxischen Reaktionen. Die geringfügigen Schwankungen der Lymphozyten-Zytotoxizität sind vergleichbar mit denen von Kontrollpersonen.

Die Lymphozyten-Zytotoxizitäts-Werte liegen bei den 3 Kontrollpersonen im Normalbereich und sind in dem beobachteten Zeitraum im wesentlichen gleichbleibend. Man kann davon ausgehen, daß diese Lymphozyten-Zytotoxizität bei den Kontrollpersonen wie bei den 3 der 5 Patienten auf die natürliche Zytotoxizität, vermittelt durch NK-Zellen, zurückzuführen ist.

Tabelle 10:

Patientenüberwachung durch CEA-spezifische Lymphozyten-Zytotoxizitäts-Teste

Patient 1: 70 Jahre alt, Magenkarzinom
CEA-Gehalt des Serums bei der 1. Blutentnahme 1,2 ng/ml
bei der 2. Blutentnahme 4,5 ng/ml

Lymphozyten vorinkubiert mit	3 Tage nach der Operation		21 Tage nach der Operation	
	% Zytotoxizität	% Hemmung der Zytotoxizität	% Zytotoxizität	% Hemmung der Zytotoxizität
-	55 % ***	-	61 % ***	NS
IC-Fraktion von Normalserum	50 % ***	-	64 % ***	-
CEA-IC 2			48 % ***	24 % *
CEA-IC 3	47 % ***	NS		
CEA-IC 5			45 % ***	24 % *
CEA-IC 2 + CEA (1:1)			48 % ***	24 % *
CEA-IC 3 + CEA (1:1)	54 % ***	-		
CEA-IC 5 + CEA (1:1)			50 % ***	21 % *
CEA	47 % ***	NS		
Anti-CEA-Ziegenserum + CEA			53 % ***	16 % *

Fortsetzung von Tabelle 10:

Patient 2: 57 Jahre alt, Rektumkarzinom
CEA-Gehalt des Serums bei der 1. Blutentnahme 1,6 ng/ml
bei der 2. Blutentnahme 3,5 ng/ml

Lymphozyten vorinkubiert mit	5 Tage nach der Operation		17 Tage nach der Operation	
	% Zytotoxizität	% Hemmung der Zytotoxizität	% Zytotoxizität	% Hemmung der Zytotoxizität
-	41 % ***	-	71 % ***	NS
IC-Fraktion von Normalserum	29 % ***	-	74 % ***	-
CEA-IC 2			60 % ***	19 % **
CEA-IC 3	27 % ***	NS		
CEA-IC 5			44 % ***	41 % **
CEA-IC 2 + CEA (1:1)			63 % ***	15 % *
CEA-IC 3 + CEA (1:1)	29 % ***	NS		
CEA-IC 5 + CEA (1:1)			29 % ***	60 % ***
CEA	24 % ***	NS		
Anti-CEA-Ziegenserum + CEA			43 % ***	42 % ***

Fortsetzung von Tabelle 10:

Patient 3: 69 Jahre alt, Rektumkarzinom
CEA-Gehalt des Serums bei der 1. Blutentnahme 2,7 ng/ml
bei der 2. Blutentnahme 2,1 ng/ml

Lymphozyten vorinkubiert mit	3 Tage nach der Operation		42 Tage nach der Operation	
	% Zytotoxizität	% Hemmung der Zytotoxizität	% Zytotoxizität	% Hemmung der Zytotoxizität
-	20 % ***	-	29 % ***	-
IC-Fraktion von Normalserum	22 % ***	-	31 % ***	-
CEA-IC 3	17 % ***	NS		
Anti-CEA-Ziegenserum + CEA	17 % ***	NS	35 % ***	-

Patient 4: 66 Jahre alt, Sigmakarzinom
CEA-Gehalt des Serums bei der 1. Blutentnahme 3,6 ng/ml
bei der 2. Blutentnahme 2,9 ng/ml

	6 Tage nach der Operation		37 Tage nach der Operation	
-	14 % ***	-	35 % ***	-
IC-Fraktion von Normalserum	16 % ***	-	36 % ***	-
CEA-IC 3	10 % ***	NS	33 % ***	NS
Anti-CEA-Ziegenserum + CEA	16 % ***	-	29 % ***	NS

Fortsetzung von Tabelle 10:

Patient 5: 67 Jahre alt, Sigmakarzinom
CEA-Gehalt des Serums bei der 1. Blutentnahme 2,2 ng/ml
bei der 2. Blutentnahme 1,0 ng/ml

Lymphozyten vorinkubiert mit	9 Tage nach der Operation		35 Tage nach der Operation	
	% Zytotoxizität	% Hemmung der Zytotoxizität	% Zytotoxizität	% Hemmung der Zytotoxizität
-	23 % ***	-	30 % ***	-
IC-Fraktion von Normalserum	28 % ***	-	35 % ***	-
CEA-IC 3	32 % ***	-	27 % ***	NS
Anti-CEA-Ziegenserum + CEA	28 % ***	-	32 % ***	NS

Die Signifikanz der Lymphozyten-Zytotoxizität und der Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität wurde nach dem Student-T-Test bestimmt, wobei *** $P < 0{,}001$; ** $P < 0{,}01$; * $P < 0{,}05$; NS = nicht signifikant bedeutet.

Tabelle 11:
Lymphozyten-Zytotoxizität von Kontrollpersonen nach mehrmaliger Blutentnahme

Testperson	1. Bestimmung der Lymphozyten-Zytotoxizität	2. Bestimmung der Lymphozyten-Zytotoxizität (Tage nach 1. Bestimmung)	3. Bestimmung der Lymphozyten-Zytotoxizität (Tage nach 1. Bestimmung)
Kontrollperson 1	17 % ***	21 % *** (144)	10 % *** (158)
Kontrollperson 2	23 % ***	29 % *** (78)	17 % *** (122)
Kontrollperson 3	18 % ***	12 % *** (61)	30 % *** (101)

Die Signifikanz der Lymphozyten-Zytotoxizität wurde nach dem Student-T-Test bestimmt, dabei bedeutet *** $P < 0{,}001$.

F. CEA-spezifische Lymphozyten-Stimulation

Lymphozyten, die in Kultur genommen und für mehrere Tage inkubiert werden, wachsen und teilen sich nicht. Durch Zugabe von bestimmten Mitogenen werden die sogenannten kleinen Lymphozyten zur Transformation in große Lymphoblasten angeregt (82). In den stimulierten Lymphozyten findet als erste Wirkung der Mitogene vermehrte RNS-Synthese, dann Proteinsynthese und schließlich DNS-Neubildung und somit Mitose statt (4).

Man kann die bekannten Lymphozyten-aktivierenden Substanzen in zwei Gruppen einteilen:
die nicht-spezifischen und die spezifischen Mitogene.

Die nicht-spezifischen Mitogene wie Phytohämagglutinin (PHA), Pokeweed (PWM), Concanavalin A, Streptolysin S stimulieren eine größere Anzahl von Lymphozyten von allen normalen Individuen und induzieren den biochemischen und physiologischen Wechsel in den Zellen sehr schnell nach Zugabe zu der Lymphozyten-Suspension (innerhalb einer Stunde) (83). Durch PHA werden so z.B. 60 - 80 % der normalen Blut-Lymphozyten innerhalb 2 - 3 Tagen in DNS-synthetisierende Lymphoblasten transformiert (84).

Die spezifischen Mitogene wie Tuberkulin und bestimmte Antigene stimulieren nur Lymphozyten von sensibilisierten Individuen. Nur ca. 50 % der normalen Blut-Lymphozyten werden durch diese spezifischen Mitogene direkt oder indirekt zur Transformation angeregt und es dauert 5 - 7 Tage, bis eine maximale Antwort erreicht ist (84).

Zur näheren Untersuchung der zellulären Immunität von Patienten mit Magen-Darm-Karzinomen wurde im folgenden versucht, mit isoliertem CEA als Antigen spezifisch sensibilisierte Lymphozyten nachzuweisen. Der Grad der Stimulation wurde durch Einbau von Tritium-markiertem Thymidin in neu gebildete DNS bestimmt.

Als Kontrolle, ob die untersuchten Lymphozyten intakt und überhaupt stimulierbar sind sowie zur Überprüfung der angewandten Methode wurden parallel zur CEA-Stimulation auch Lymphozyten mit PHA inkubiert (85).

Nach der Isolation der Lymphozyten aus dem peripheren Blut wurden je 5×10^5 Zellen in 0,1 ml Medium in die Vertiefungen der Mikrotestplatten II verteilt. Zugegeben wurden anschließend verschiedene Konzentrationen von CEA und parallel dazu als Positiv-Kontrolle verschiedene Konzentrationen von PHA in je 0,1 ml Medium. Von jeder Konzentration wurden mindestens 3 Proben angefertigt. Als Negativ-Kontrolle diente die Zugabe von Medium zu der Lymphozyten-Suspension.

Nach 2 bzw. 6 Tagen Inkubation der Proben bei 37 °C im begasten Brutschrank wurden 1 µCi ^{3}H-Thymidin in 0,1 ml Medium pro Probe zugegeben und für 20 Stunden inkubiert.

Vor dem Aufarbeiten der Proben wurde die Veränderung der Lymphozyten durch die Einwirkung der Mitogene im Mikroskop beobachtet. In den mit PHA behandelten Proben zeigten sich oft einige große Anhäufungen der Lymphozyten, bei den mit CEA inkubierten Proben wurden nur in einigen Fällen viele kleine Anhäufungen der Lymphozyten festgestellt. Die mit Medium inkubierten Proben wiesen keine oder nur selten ebenfalls viele kleine Lymphozyten-Anhäufungen auf.

Bei der Aufarbeitung der Proben wurde die DNS der Lympho-

zyten isoliert und das eingebaute, radioaktiv markierte ^{3}H-Thymidin gemessen.

Die Ergebnisse der CEA-spezifischen Lymphozyten-Stimulation sind in Tabelle 12 im Vergleich zur Stimulation mit PHA dargestellt und werden als Mittelwerte des Thymidineinbaus (cpm $\pm$ Standardabweichung) ausgedrückt. Außerdem ist in der Tabelle aufgenommen, ob die Patienten in den Seren nachweisbare CEA-Immunkomplexe aufwiesen, d.h. ob die Lymphozytenpopulation der entsprechenden Patienten auch CEA-Antikörperproduzierende Zellen enthalten haben.

Die Kontrollpersonen in dem CEA-spezifischen Stimulationstest zeigen durch CEA eine induzierte Stimulation vom maximal 4,4-fachen. Dabei ist anzunehmen, daß diese Stimulation weitgehend als unspezifischer Hintergrund angesehen werden kann. Im folgenden wird daher eine Stimulation nur dann als CEA-spezifisch betrachtet, wenn der Stimulationsindex (SI) größer als 5 ist.

Aus der Tabelle 12 ist zu ersehen, daß nur 7 von 10 Patienten eine CEA-spezifische Lymphozyten-Stimulation aufweisen. Darunter sind auch die beiden Patienten, bei denen zirkulierende CEA-Immunkomplexe im Serum festgestellt wurden, was letztlich bedeutet, daß diese Patienten CEA-Antikörper-bildende Zellen haben müssen. Die CEA-spezifische Stimulation bei den anderen 5 Patienten, bei denen keine CEA-Immunkomplexe im Serum feststellbar waren, ist möglicherweise auf spezifisch sensibilisierte zytotoxische Lymphozyten zurückzuführen, vielleicht auch auf CEA-Antikörper-produzierende Zellen, die jedoch nur so wenig Antikörper bilden, daß sie im Serum nicht nachgewiesen werden konnten.

Zur Untersuchung der Dosisabhängigkeit der Stimulation wurden verschiedene Dosen an CEA und PHA zu den Lymphozyten gegeben. Bei einigen Patienten konnte man erst durch höhere Dosen an CEA eine schwache Stimulation feststellen, so z. B.

bei Patient 1,5,6. Dagegen hat es den Anschein, daß bei Patienten, deren Lymphozyten schon bei niederen Dosen an CEA mit erhöhtem ^{3}H-Thymidin-Einbau reagieren, durch Erhöhung der CEA-Dosis eine Hemmung der Stimulation eintreten kann (z.B. bei Patient 3), wie dies auch bei der Stimulation durch PHA beschrieben wurde (82).

Die Interpretation der CEA-spezifischen Stimulationswerte ist hinsichtlich der Kontrollwerte - das sind die Stimulationsindizes, die mit PHA bestimmt wurden - äußerst schwierig. Die PHA-Stimulation ist nämlich für individuelle Lymphozyten-Präparationen zum großen Teil stark dosisabhängig und ist von Individuum zu Individuum verschieden. Die Ursachen dafür können biologisch als auch abhängig von der Präparationstechnik sein. Für die Wertung der CEA-spezifischen Stimulationsindizes kann daher nur ein relativer Maßstab gültig sein, der immer Unsicherheiten der Meßtechnik beinhaltet.

Tabelle 12:

Stimulation der Lymphozyten von Patienten und Kontrollpersonen mit CEA und PHA
(SD = Standardabweichung)

Testpersonen	Primär-karzinom	zirkulierende CEA-Immunkoplexe	Lymphozyten-Stimulation			Stimulationsindex	
			Dosis in g/Probe	mit CEA (cpm ± SD)	mit PHA (cpm ± SD)	CEA	PHA
Kontroll-person 1	-	nicht bestimmt	-	214 ± 156			
			0,25	515 ± 130	1 174 ± 392	2,4	5,5
			2,5	739 ± 288	17 847 ± 7 979	3,5	83,4
			25	-	41 102 ± 5 574	-	192,1
Kontroll-person 2	-	nicht bestimmt	-	4 305 ± 2 404			
			0,25	10 238 ± 7 581	4 995 ± 773	2,4	1,2
			2,5	9 157 ± 2 504	16 320 ± 436	2,1	3,8
			13	12 416 ± 132	-	2,9	-
			25	-	29 329 ± 7 900	-	6,8
Kontroll-person 3	-	nicht bestimmt	-	3 494 ± 2 567			
			0,25	12 771 ± 1 539	10 890 ± 300	3,7	3,1
			2,5	15 379 ± 1 411	24 415 ± 1 334	4,4	7,0
			13	10 804 ± 2 051	-	3,1	-
			25	-	53 630 ± 27 152	-	15,3
Patient 1	Rektum-	negativ	-	277 ± 180			
			0,25	478 ± 419	-	1,7	
			2,5	1 766 ± 1 625	20 836 ± 9 109	6,4	75,2
			25	-	24 685 ± 9 404	-	89,1

Fortsetzung von Tabelle 12:

Testpersonen	Primär-karzinom	zirkulierende CEA-Immunkomplexe	Lymphozyten-Stimulation			
			Dosis in g/Probe	mit CEA (cpm ± SD)	mit PHA (cpm ± SD)	Stimulationsindex CEA	Stimulationsindex PHA
Patient 2	Rektum-	nicht bestimmt	-	1 708 ± 1 166			
			0,25	1 738 ± 66	473 ± 127	1,0	0,3
			2,5	1 569 ± 843	10 998 ± 3 490	0,9	6,4
			15	-	100 143 ± 8 848	-	58,6
			25	-	16 163 ± 8 483	-	9,5
Patient 3	Kolon-	positiv	-	1 703 ± 1 730			
			0,25	19 796 ± 5 308	-	11,6	-
			2,5	47 826 ± 20 058	45 203 ± 10 972	28,1	26,5
			13	18 435 ± 10 241	-	10,8	-
			25	-	16 063 ± 663	-	9,4
Patient 4	Kolon-	positiv	-	1 210 ± 213			
			0,25	10 670 ± 6 270	6 670 ± 1 068	8,8	5,6
			2,5	13 666 ± 4 491	45 536 ± 15 638	11,3	37,9
			13	18 055 ± 6 581	-	14,9	-
			25	-	17 056 ± 1 379	-	14,2
Patient 5	Sigma-	nicht bestimmt	-	1 762 ± 611			
			0,25	1 962 ± 1 394	9 690 ± 7 778	1,1	5,5
			2,5	3 223 ± 3 020	28 440 ± 6 182	1,8	16,1
			13	11 982 ± 2 327	-	6,8	-
			25	-	114 770 ± 20 870	-	65,1

Fortsetzung von Tabelle 12:

Testpersonen	Primär-karzinom	zirkulierende CEA-Immunkomplexe	Lymphozyten-Stimulation			
			Dosis in g/Probe	mit CEA (cpm ± SD)	mit PHA (cpm ± SD)	Stimulationsindex CEA	Stimulationsindex PHA
Patient 6	Rektum-	negativ	-	2 663 ± 2 481			
			0,25	2 737 ± 1 951	12 861 ± 6 665	1,0	4,8
			2,5	3 353 ± 2 624	28 775 ± 1 171	1,3	10,8
			13	17 749 ± 7 881	-	6,7	-
			25	-	46 176 ± 24 195	-	17,3
Patient 7	Rektum-	nicht bestimmt	-	1 683 ± 1 636			
			0,25	2 211 ± 495	629 ± 309	1,3	0,4
			2,5	3 173 ± 1 357	41 832 ± 30 165	1,9	24,8
			13	6 445 ± 2 861	-	3,8	-
			25	-	146 267 ± 39 585	-	86,9
Patient 8	Sigma-	negativ	-	2 356 ± 1 226			
			2,5	9 285 ± 9 254	159 358 ± 5 304	3,9	67,6
			10	10 605 ± 2 303	131 558 ± 40 624	4,5	55,8
Patient 9	Sigma-	negativ	-	1 727 ± 1 139			
			2,5	22 299 ± 17 271	181 609 ± 17 561	12,9	105,2
			10	32 513 ± 19 989	207 031 ± 34 940	18,8	119,9
Patient 10	Rektum-	negativ	-	907 ± 638			
			2,5	-	112 375 ± 60 461		123,9
			10	8 008 ± 2 248	94 434 ± 42 611	8,8	104,1

G. Zusammenfassung

Der Immunstatus von Patienten mit Karzinomen des Magen-Darm-Traktes wurde durch zellvermittelte Immunreaktionen mit CEA-Spezifität charakterisiert. Hierzu wurden zwei in vitro-Methoden herangezogen: die Lymphozyten-Zytotoxizität gegenüber einer menschlichen Zielzelle mit CEA als Oberflächenantigen und die spezifische Stimulierbarkeit der Patientenlymphozyten durch hochgereinigtes menschliches CEA.

Zur Durchführung des Lymphozyten-Zytotoxizitäts-Testes wurden verschiedene Zielzellen mit CEA-Spezifität, die einerseits von 22 Primärkulturen aus menschlichem Biopsiematerial, andererseits aus permanenten Zell-Linien stammten, miteinander verglichen. Die permanente menschliche Zell-Linie HT 29 entsprach am besten den vorgegebenen Kriterien einer Zielzelle: sie wies über 2 Jahre hinweg einen konstanten CEA-Gehalt auf. Eine Sezernierung von freiem CEA während der Testdauer konnte unter den gegebenen Bedingungen ausgeschlossen werden, so daß keine kompetitive Hemmung der Reaktion mit dem zellständigen CEA angenommen werden mußte.

Die Patientenlymphozyten wurden aus dem peripheren Blut mit der Ficoll-Isopaque-Methode isoliert, wodurch eine gemischte Lymphozyten-Population erhalten wurde.

Der Grad der Lymphozyten-Zytotoxizität konnte durch die Freisetzung von ^{3}H-Prolin aus den vormarkierten Zielzellen quantitativ gemessen werden. Kontrollversuche mit Lymphozyten von gesunden Personen ergaben ein Maß für die unspezifische Zytotoxizität, die durch natürliche Killer-Zellen ausgelöst wird. 8 von 15 Patienten wiesen gegenüber 13 Kontrollpersonen eine erhöhte Lymphozyten-Zytotoxizität auf. Zum Nachweis einer CEA-Spezifität dieser erhöhten Reaktivität gegen die Zielzelle HT 29

wurde versucht, die Lymphozyten-Zytotoxizität durch autologe und heterologe CEA-Immunkomplex-Fraktionen, heterologen Anti-CEA-Antikörper und freies CEA spezifisch zu hemmen. Bei diesen Hemmversuchen wurde festgestellt, daß 4 von 8 Patienten eine signifikant erniedrigte Lymphozyten-Zytotoxizität zeigten. In einem Fall ist die CEA-Spezifität deutlich belegt, da auch ein Hemmeffekt durch den heterologen CEA-Immunkomplex zustandekommt.

Durch diese Ergebnisse wird belegt, daß Patienten mit Magen-Darm-Krebs eine zellvermittelte Immunität gegen ein tumorassoziiertes onko-foetales Antigen, nämlich gegen CEA, aufbauen können. Ferner zeigt es sich, daß Patientenseren Komponenten enthalten können, die diese spezifische Immunität blockieren können.

Die postoperative Überwachung von Patienten mit Lymphozyten-Zytotoxizitäts-Testen wurde durchgeführt, um feststellen zu können, ob man den klinischen Verlauf der Erkrankung eines Patienten (z.B. Rezidivbildung) mit dem Grad der CEA-spezifischen Zytotoxizität seiner Lymphozyten korrelieren kann. Bisher wurden 5 Patienten in dieses Überwachungsprogramm aufgenommen. 2 der 5 Patienten zeigten 2 - 3 Wochen nach der Operation eine CEA-spezifische Lymphozyten-Zytotoxizität gegen HT 29-Zellen, die kurz nach der Operation (3 - 5 Tage) noch nicht nachzuweisen war, assoziiert mit einem Anstieg von freiem CEA im Serum. Die Zytotoxizitätswerte der anderen 3 der 5 Patienten lagen im Normalbereich von Kontrollpersonen. Bei allen 5 Patienten gab es bisher klinisch keinen Anhaltspunkt auf Rezidivverdacht.

Als zweite in vitro-Methode zur Charakterisierung der CEA-spezifischen zellvermittelten Immunität von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren wurde die CEA-spezifische Lymphozyten-Stimulations-Methode gewählt. Die spezifische Transformation der Lymphozyten in Lymphoblasten durch das Tumorantigen wurde durch ^{3}H-Thymidin-Einbau bestimmt. Zur Kontrolle der Lebens-

fähigkeit der Lymphozyten sowie der angewandten Aufarbeitungs-
methode wurden die Versuche parallel mit der unspezifischen
Stimulation durch PHA durchgeführt. Bei 7 von 10 Patienten
konnte man CEA-spezifische Lymphozyten-Stimulation feststellen,
verglichen mit der weit höheren Stimulation von Lymphozyten
mit PHA war eine Deutung dieser Ergebnisse sehr schwierig.

H. Diskussion

Der Immunstatus von Krebspatienten, der für die Tumorentwicklung maßgebend sein kann, läßt sich am eindeutigsten durch in vitro-Reaktionen gegen autochthone Tumorzellen charakterisieren. Für die angestrebte Routine-Überwachung der zellvermittelten Tumorimmunität der Patienten würde dies jedoch umfangreiche technische Vorarbeiten erfordern, d.h. es müßten für jeden Patienten vom individuellen Tumor Primärkulturen angelegt werden. Um jedoch Routine-Kontrollen des Immunstatus praktikabel zu machen, empfahl es sich, eine permanente humane Tumorzell-Linie als Zielzelle zu verwenden, die CEA als Oberflächenantigen besitzt und in ihren biologischen Kriterien über lange Zeit hinweg stabil bleibt. Mit einer solchen Zelle können allerdings nur CEA-spezifische Immunreaktionen überwacht werden. Dies ist insofern ein Nachteil, da anzunehmen ist, daß gastrointestinale Tumoren auch noch andere Tumorantigene besitzen. Für die in dieser Arbeit angestrebte Entwicklung eines Routine-Testes wurde jedoch der CEA-Spezifität ein Vorrang eingeräumt. Die Kriterien der biologischen Stabilität wurden am besten von der Zell-Linie HT 29, die aus einem menschlichen Kolon-Karzinom stammt, erfüllt.

Zur Überwachung von Patienten mit malignen Magen-Darm-Karzinomen wurden zwei in vitro-Methoden zur Messung CEA-spezifischer zellvermittelter Immunreaktionen untersucht, deren Ergebnisse sinnvoll interpretierbar sowie mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung möglichst direkt korrelierbar sein sollten. Bei der CEA-spezifischen Stimulation von Patientenlymphozyten können die durch dieses Antigen zur Proliferation angeregten Lymphozyten durch den Einbau von ^{3}H-Thymidin bestimmt werden. Lymphozyten von Patienten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von CEA und außerdem als Positiv-

Kontrolle mit verschiedenen Konzentrationen von PHA inkubiert. Die CEA-Stimulationsindizes der Patienten liegen in 7 von 10 Fällen etwas erhöht über denen der vergleichbaren Kontrollpersonen. Die Ergebnisse der Stimulation mit PHA zeigen jedoch weit höhere Werte an, was eine Interpretation der CEA-spezifischen Stimulationswerte sehr erschwert. Es besteht vielleicht die Möglichkeit, daß es nicht gelungen ist, eine optimale Konzentration an CEA für diese Versuche zu erreichen, da ja auch die Stimulation von Lymphozyten mit CEA stark dosisabhängig ist, wie dies mit PHA der Fall ist.

In früheren Versuchen (85), die unter ähnlichen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden, ergab sich keine signifikante Stimulierung von Patientenlymphozyten mit Magen-Darm-Krebs durch CEA.

Aufgrund der begrenzten Lymphozytenzahl, die bei einer einmaligen Entnahme vom Patienten erhalten werden konnte, war es nicht möglich, zwei in vitro-Methoden zur Bestimmung der zellulären Immunreaktion eines Patienten nebeneinander durchzuführen. Daher konnten die in dieser Arbeit gefundenen Stimulationswerte nicht durch eine zweite davon verschiedene Methode abgesichert werden.

Der grundsätzliche Nachteil des Lymphozyten-Stimulationstestes lag in der Tatsache, daß pro Stimulationswert eine große Zahl von Patientenlymphozyten eingesetzt werden mußte. Dieser Nachteil besteht bei der Messung der Lymphozyten-Zytotoxizität nicht, da hier pro Zytotoxizitätswert 10 mal weniger Lymphozyten gebraucht werden. Dies war ausschlaggebend für die weitere methodische Entwicklung in dieser Arbeit, in der für die Charakterisierung der CEA-spezifischen zellvermittelten Immunreaktionen bevorzugt der Lymphozyten-Zytotoxizitäts-Test eingesetzt wurde. Mit dieser Entscheidung wurde vermieden, daß die z.T. schwer kranken Patienten eine unzumutbare Be-

lastung durch übergroße Blutentnahme zu ertragen hatten.

Bei der Untersuchung der Lymphozyten-Zytotoxizität konnte davon ausgegangen werden, daß die Zytotoxizität, die von Lymphozyten gegen Zielzellen bewirkt wird, in eine unspezifische und spezifische Zytotoxizität unterteilt werden kann. In einer Lymphozyten-Population sind unter anderem sogenannte natürliche Killer-(NK)-Zellen vorhanden, die über verschiedene Mechanismen die Zielzellen zerstören können. Diese NK-Zellen sind sowohl bei Patienten als auch bei gesunden Personen zu finden und ihre Zellzerstörung ist unspezifisch. Eine spezifische Zytotoxizität kann über zytotoxische T-Lymphozyten vermittelt werden, die Antikörper-unabhängig sind, und über Antikörper-abhängige Killer-Zellen. Diese beiden Arten der spezifischen Zellzerstörung sind bei Tumorpatienten gegen die Tumorantigene eines jeden individuellen Tumors gerichtet. Es ist jedoch anzunehmen, daß im vorgegebenen Zytotoxizitäts-Meßsystem auf der HT 29-Zielzelle nicht alle möglichen Tumorantigene der gastrointestinalen Tumoren vorliegen, so daß mit der über das Normalmaß hinaus überhöhten Zytotoxizität nur ein Teil der möglichen Anti-Tumor-Reaktionen des Patienten erfaßt werden. Durch Hemmung der Zytotoxizität mit freiem CEA, CEA-spezifischem Antikörper und CEA-Immunkomplexen wird der CEA-spezifische Anteil der Anti-Tumor-Reaktion charakterisiert.

Nachdem bei 8 von 15 Patienten eine deutliche Erhöhung der Lymphozyten-Zytotoxizität gegenüber 13 Kontrollpersonen festzustellen war, wurde versucht,die CEA-Spezifität der Reaktionen abzuklären. Die spezifischen Zytotoxizitätsreaktionen mußten durch die spezifisch blockierenden Faktoren zu hemmen sein, die auch im Patientenserum vorkommen können. Für den Patienten würde dies bedeuten, daß seine Tumorabwehr durch solche blockierende Faktoren wesentlich geschwächt werden kann.

Zunächst wurden Patientenlymphozyten mit 2 Patientenseren,

die sowohl freies als auch komplex-gebundenes CEA enthielten, vorinkubiert und anschließend mit der Zielzelle zur Reaktion gebracht. Bei allen 6 Patienten war ein signifikanter Rückgang der Lymphozyten-Zytotoxizität nach Behandlung mit den Patientenseren zu beobachten.

Um die blockierenden Faktoren näher zu charakterisieren, wurden Patientenseren über Gelpermeation aufgetrennt und so CEA-Immunkomplex-Fraktionen isoliert. Da man sich vorstellen kann, daß in den Fraktionen aus Serum noch genügend unbekannte Komponenten vorhanden sind, die eine spezifische Lymphozyten-Zytotoxizität beeinflußen können, wurde außerdem ein künstlicher heterologer CEA-Immunkomplex aus exogenem freiem CEA und Anti-CEA-Ziegenserum in die Versuchsreihe aufgenommen. Daneben wurden die Lymphozyten mit freiem CEA, mit Anti-CEA-Ziegenserum und mit den CEA-Immunkomplexen unter Zugabe von freiem CEA zur Verlagerung des Gleichgewichts in Richtung Immunkomplexe vorinkubiert. Bei der Hemmung mit CEA-Immunkomplexen muß jedoch der Tatsache Rechnung getragen werden, daß Immunkomplexe in hoher Verdünnung parziell in Antigen und Antikörper dissoziiert sind.

Es konnte bei 4 von 8 Patienten eine signifikante Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität durch CEA-Immunkomplexe festgestellt werden. Besonders deutlich kann man den Rückgang der Lymphozyten-Zytotoxizität beobachten, wenn die Zytotoxizitätswerte über 70 % liegen. 3 von 8 Patienten zeigen keine signifikante Hemmung der Zytotoxizität und in einem Fall tritt nur signifikante Hemmung durch freies CEA auf. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß CEA-spezifische Reaktionen der Lymphozyten vorliegen, besonders deutlich konnte dies auch durch die Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität mit heterologem CEA-Immunkomplex bestätigt werden. Ferner muß vermerkt werden, daß auch die Patientenseren Komponenten enthalten, die diese CEA-spezifischen Lymphozyten-Reaktionen hemmen können.

Die bisherige Verlaufsüberwachung von Patienten zeigt in 3 Fällen keine zytotoxischen Lymphozyten-Reaktionen gegen HT 29-Zellen während des Überwachungszeitraums, und die Ergebnisse können mit denen von Kontrollpersonen verglichen werden. Bei 2 Patienten wurde 2 - 3 Wochen nach der Operation ein Ansteigen der Lymphozyten-Zytotoxizität gegen HT 29-Zellen mit signifikanter CEA-spezifischer Hemmung festgestellt, obwohl kurz nach der Operation in beiden Fällen noch keine Zytotoxizität nachweisbar war. Diese fehlende Zytotoxizität kann nach neueren Erkenntnissen durch eine Operationsstress-induzierte Immunsuppression hervorgerufen werden (92). Parallel zur ansteigenden Lymphozyten-Zytotoxizität ist auch bei den beiden genannten Patienten eine Erhöhung der Konzentration an freiem CEA im Serum zu beobachten, was nach den bisherigen Erfahrungen auf weiteres Tumorwachstum (z.B. durch verbliebene Tumormasse, Rezidivierung und/oder Metastasierung) schließen läßt (93). Ähnliche Befunde, steigende Lymphozyten-Zytotoxizität assoziiert mit steigender CEA-Konzentration im Serum, wurden schon früher beobachtet (36). Allerdings wurde in diesem Fall die CEA-Spezifität der Lymphozyten-Zytotoxizität nicht getestet.

I. Material

1. Geräte

a) Immunfluoreszenzmikroskop (Photomikroskop mit Fluoreszenzleuchte),	Fa. Carl Zeiss, Oberkochen
b) Szintillationsmeßgerät Tri Carb, Modell 3385,	Fa. Packard, Downers Grove, Ill., USA
c) P_H-Meter, Modell 3560,	Fa. Beckmann, München
d) Spektralphotometer Zeiss PMQ II,	Fa. Carl Zeiss, Oberkochen
e) Fraktionssammler Serva Linear II mit Signalgeber STZ,	Fa. Serva, Heidelberg
f) Amicon-Ultrafiltrationskammer, Modell 8 MC mit PM 30-Filtern,	Fa. Amicon Corp., Lexington, Mass., USA
g) Laborzentrifuge UJ I KS,	Fa. Heraeus-Christ, Osterode
h) Kühlzentrifuge Sorvall RC 3,	Fa. Du Pont, Newtown, Conn., USA

2. Chemikalien

Soweit nicht gesondert aufgeführt, handelt es sich um analysenreine Substanzen der Fa. Merck AG, Darmstadt.

a) [Carbonyl- ^{14}C]- Nicotinamid,
spez. Aktivität 50 mCi/mmol, Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig

b) L-[2,3,4,5- ^{3}H]- Prolin,
spez. Aktivität 80 - 110 Ci/mmol, Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig

c) [Methyl-^{3}H]- Thymidin,
spez. Aktivität 40 - 60 Ci/mmol, Fa. New England Nuclear Chemicals GmbH, Dreieich

d) 2-Desoxythymidin, Fa. Serva, Heidelberg

e) NCS Tissue Solubilizer, Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig

f) CEA-Roche-RIA-Test, Fa. Hoffmann-La Roche & Co. AG Diagnostica, Basel

g) Säulenmaterial Sephadex 200, Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden

h) Lymphoprep, Fa. Molter, Heidelberg

i) Phythohämagglutinin-P, Fa. Seromed, München

k) CEA aus Präparation von Lebermetastasen von Herrn Dr. H.-J. Staab zur Verfügung gestellt;

l) Kolchizin, Fa. Serva, Heidelberg

m) Penicillin, Fa. Bayer, Leverkusen

n) Streptomycin, Fa. Bayer, Leverkusen

o) Foetales Kälberserum, Fa. Seromed, München

p) Trypsin, rein, 1 : 250
für die Gewebekultur, Fa. Serva, Heidelberg

q) HEPES = N-2-Hydroxy-
äthylpiperazin-N-2-
äthansulfonsäure, Fa. Serva, Heidelberg

3. Seren

a) FITC-konjugiertes Anti-
Kaninchen-IgG von der Ziege, Fa. Miles, Frankfurt

b) Patientenseren von der Chirurgischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Stuttgart-Bad Cannstatt;

c) Kontrollseren von klinisch gesunden bzw. nicht an malignen Tumorerkrankungen leidende Personen aus der Chirurgischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Stuttgart-Bad Cannstatt und von Institutsangehörigen;

d) Anti-CEA-Antiserum vom Kaninchen von Herrn Dr. H.-J. Staab zur Verfügung gestellt;

e) Anti-CEA-Antiserum von der Ziege von Herrn Dr. H.-J. Staab zur Verfügung gestellt;

4. Nährmedien

a) Für Primärkulturen aus menschlichem Tumormaterial:
Dulbeccos Minimal Essential Medium - im Verhältnis 1 : 2 vermischt mit - Medium 199 (Fa. Seromed, München) + 20 % foetales Kälberserum (FBS);

Für die Einbau-Versuche wurden die Medien ohne Nicotinamid bzw. ohne Prolin hergestellt, um den Einbau der radioaktiv markierten Substanzen zu erhöhen (40, 87);

b) Für die permanente Zell-Linie HT 29, die von Prof. Dr. Warnatz aus Erlangen freundlich zur Verfügung gestellt wurde:
RPMI 1640-Medium (Fa. Seromed, München) + 15 % FBS;

2 - 3 Tage vor dem Markieren der Zellen mit ^{3}H-Prolin für die Lymphozyten-Zytotoxizitäts-Teste wurden die Zellen in RPMI 1640-Medium ohne Prolin + 15 % FBS wachsen lassen;

c) Für die Lymphozyten-Kulturen (86):
RPMI 1640-Medium + 20 % FBS + 20 mM HEPES-Puffer

5. Lösungen und Puffer

a) Saline: 0,9 %-ige NaCl-Lösung

b) Phosphat-gepufferte Saline (PBS^{-}): 8 g NaCl; 0,2 g KCl;
1,44 g $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$;
1 g KH_2PO_4; ad 1 l H_2O
p_H-Wert 7,2;

c) Phosphat-gepufferte Saline^{+} (PBS^{+}): PBS^{-} + Ca^{++} und Mg^{++};

d) Trypsin-Lösung (0,25 % für die Gewebekultur):
10 ml 10 % Trypsin-Lösung
370 ml PBS^{-}
20 ml PBS^{-} + 1 % EDTA
1 ml 1 N NaOH;

e) Sodium-Dodecylsulfat-Lösung (SDS): 1 %-ige Lösung;

f) Thymidin-Lösung: 10 mM Thymidin + 10 mM $Na_4P_2O_7$ x 10 H_2O;

g) Dioxan-Szintillationslösung: 4 g PPO; 0,2 g POPOP; 60 g Naphtalin; 20 ml Äthylenglykol; 100 ml Methanol; ad 1 l Dioxan;

h) Toluol-Szintillationslösung: 5 g PPO; 0,1 g POPOP; ad 1 l Toluol;

i) Natrium-Phosphatpuffer 0,1 M, p_H-Wert 7,2:
19,4 g NaH_2PO_4 x H_2O;
64,0 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O;
0,5 g NaN_3; ad 5 l aqua dest.;

k) HEPES-Puffer: 10-facher Ansatz = 200 mM
4,76 g HEPES / 100 ml aqua dest.; mit 1 N NaOH auf p_H-Wert 7,2 - 7,4 einstellen;

6. Sonstige Materialien

a) Filterrondelle Whatman Grade 3 MM, Ø 2,5 cm, Fa. W.R. Balston Ltd., Maidstone, England

b) Visking-Dialyse-Schläuche	Fa. Union Carbide Corp., Chicago, Ill., USA
c) Zellkulturflaschen	Fa. Becton & Dickenson, Heidelberg
d) Petrischalen	Fa. Becton & Dickenson, Heidelberg
e) Mikrotest-Platten (10 µl pro Vertiefung)	Fa. Nunc, Wiesbaden
f) Mikrotest-Platten II (300 µl pro Vertiefung)	Fa. Nunc, Wiesbaden
g) Gewebekulturfläschen	Fa. Nunc, Wiesbaden

K. Methoden

1. Herstellen von Primärkulturen

Kleine Tumorgewebeteile, die bei der Operation von Patienten mit Karzinomen des Gastrointestinaltraktes entnommen wurden, wurden mit sterilem chirurgischem Besteck in ca. 1 - 3 mm kleine Stücke geschnitten und in einen kleinen sterilen Erlenmeyer-Kolben gelegt. Danach wurden die Organstückchen mit PBS^-, das 100 E/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthielt, gewaschen und in 2 Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde sofort in Medium (Dulbeccos MEM / Medium 199 + 20 % FBS + 10 E/ml Penicillin + 100 g/ml Streptomycin) aufgenommen und in einer kleinen Kulturflasche bei 37° C im begasten Brutschrank inkubiert. Die andere Hälfte der Tumorstückchen wurde in einer Lösung aus 0,025 % Trypsin, 0,05 % EDTA in PBS^- mit einem sterilen Magnetrührer 5 - 10 Minuten bei 37° C gerührt. Nach dem Absetzen der Zellen goß man den Überstand ab und rührte das Sediment nochmals 10 - 15 Minuten in der Trypsin-EDTA-Lösung bei 37° C. Dann wurden die Zellen bei 200 x g abzentrifugiert, in Medium aufgenommen und ebenfalls inkubiert.

Diese beiden Methoden wurden angewandt, da je nach Empfindlichkeit der Zellen wenigstens eine Kultur zum Wachsen kam (88).

2. Bestimmung der Immunfluoreszenz

Die mit der indirekten Immunfluoreszenz-Technik auf CEA als Oberflächenantigen zu untersuchenden Zellen wurden auf kleinen Deckgläschen in Petrischalen zum Wachsen gebracht (23,89). Die Deckgläschen waren zuvor mit 70 %-igem Äthanol

gereinigt, mit Aceton behandelt und anschließend autoklaviert worden. Waren die Zellen auf den Deckgläschen festgewachsen (meist nach 1 Tag), wurden sie entnommen und markiert, so daß die Oberseite der Deckgläschen immer gut zu erkennen war. Dann wurden die Deckgläschen mit den festgewachsenen Zellen mindestens 5 mal vorsichtig mit angewärmtem PBS^+ in kleinen Bechergläschen gewaschen und jeweils gut auf Filterpapier abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gemisch aus absolutem Äthanol, Eisessig und destilliertem Wasser im Verhältnis 5 : 2 : 3 für ca. 5 Minuten fixiert und kurz luftgetrocknet. Nach diesem Schritt konnte man die Deckgläschen mit den fixierten Zellen für einige Tage bei - 20° C einfrieren oder man konnte gleich mit der Immunfluoreszenzfärbung fortfahren. Die Deckgläschen wurden dazu auf der Zellseite etwas mit PBS^+ befeuchtet, danach mit Anti-CEA-Kaninchenserum (Verdünnung 1 : 20 mit PBS^+) überschichtet und 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur stehen lassen. Die Deckgläschen wurden danach wieder mindestens 5 mal mit angewärmtem PBS^+ gewaschen. Dann wurde die feuchte Kammer mit den Deckgläschen für ca. 30 Minuten bei 4° C abgekühlt, bevor die Zellen für weitere 30 Minuten mit FITC-konjugiertem Anti-Kaninchen-IgG-Ziegenantiserum (1 : 32 verdünnt mit PBS^+) bei 4° C im Dunkeln inkubiert wurden. Nachdem die Deckgläschen danach 5 mal mit PBS^+ gewaschen waren, wurden sie mit der Zellseite nach unten auf einen mit PBS^+-Glycerin-Gemisch im Verhältnis 9 : 1 benetzten Objektträger gelegt und im Dunkeln aufbewahrt, bis sie im UV-Licht des Immunfluoreszenzmikroskops betrachtet wurden.

3. Radioimmunologischer CEA-Test

Der quantitative Nachweis von CEA im Kulturmedium der untersuchten Zielzellen sowie in den Zielzellen selbst und im Serum von Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurde mit dem CEA-Roche-RIA-Test durchgeführt (90).

Zunächst erfolgte die Perchlorsäure-Extraktion von CEA, da die in Säure löslichen Glykoproteine (wie CEA) von den säureunlöslichen Serumbestandteilen abgetrennt werden müssen. Dazu wurde ein Aliquot des zu untersuchenden Mediums (1 ml) bzw. der Seren (0,5 ml) auf ein Volumen von 2,5 ml mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt, ebenso wurden die zu untersuchenden Zielzellen zur Überprüfung ihres CEA-Gehaltes in 2,5 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Dann wurde zu den Proben je 2,5 ml 1,2 molare Perchlorsäure zugegeben und nach gutem Schütteln und 10 - 15 minütigem Stehenlassen bei Raumtemperatur bei 3 000 Upm 20 Minuten zentrifugiert.

Zur Bestimmung von komplex-gebundenem CEA in Patientenseren wurden die Perchlorsäure-Sedimente mit 2 ml 2 molarem Tris-Puffer gelöst. Aus dieser Lösung wurden dann 0,5 ml entnommen und 4,5 ml Saline zugefügt.

Die Überstände nach der Perchlorsäure-Fällung bzw. das gelöste Sediment wurden danach in angefeuchtete Dialyseschläuche gefüllt und zur Entfernung der Säure gegen entionisiertes Wasser dialysiert, das mindestens 3 mal, nach einer Dialysierzeit von jeweils 3 Stunden, gewechselt wurde. Anschließend wurden die Proben mindestens 3 Stunden gegen 0,01 molaren Ammoniumacetat-Puffer p_H 6,5 $\pm$ 0,2 dialysiert, um eine optimale Ionenstärke und einen optimalen p_H-Wert zu erreichen. Die Proben wurden dann aus den Dialyseschläuchen zur Bestimmung der CEA-Aktivität in Teströhrchen gegeben.

Zu jeder Serie von Proben zur CEA-Bestimmung muß gleichzeitig eine Standard-Inhibitionskurve aufgestellt werden. In 5 Teströhrchen wurden je 5 ml 1 : 10 verdünnten EDTA-Puffer gegeben und dazu jeweils 0, 10, 25, 50 und 100 µl des CEA-Standards zugefügt. Somit entsprach die CEA-Aktivität in den Teströhrchen 0; 1,25; 3,125; 6,25 und 12,5 ng/ml. Aus diesen Kontrollen wurden von jedem Aktivitätsbereich 0,5 ml entnommen,

mit physiologischer Kochsalzlösung auf 2,5 ml aufgefüllt und dann bei der Perchlorsäure-Extraktion, Dialyse und Bestimmung des CEA-Gehaltes genauso behandelt wie die oben erwähnten Proben.

Im darauf folgenden Radioimmuntest wurde das extrahierte CEA aus den Proben mit spezifischem Anti-CEA-Serum in Reaktion gebracht. Dazu wurden zu jedem Teströhrchen 25 µl Ziegen-Antiserum gegeben und die Proben wurden 30 Minuten im 45° C Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 25 µl ^{125}J-markiertem CEA pro Probe und erneute Inkubation für 30 Minuten bei 45° C. Das Jod-markierte CEA reagiert mit dem im Überschuß vorliegenden Anti-CEA-Antikörper. Als nächster Schritt folgte die Zugabe von 2,5 ml Zirkonylphosphat-Gel (Z-Gel) zu jeder Probe. Das Z-Gel trennt das an den Antikörper gebundene CEA (^{125}J-CEA und das CEA aus den Proben) von überschüßigem freiem ^{125}J-CEA ab. Das Z-Gel kann Gammaglobuline und andere Proteine unterhalb ihres isoelektrischen Punktes binden, wenn die Proteinmoleküle nach außen hin positiv geladen sind (91). Die bei den Testbedingungen (p_H 6,5) positiv geladenen Antikörper können somit an das Z-Gel gebunden werden. Nach gutem Schütteln der Proben wurden diese 5 Minuten bei 3 000 Upm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Dann wurde das Z-Gel in den Proben mit 0,1 molarem Ammoniumacetat-Puffer p_H 6,25 gewaschen und es wurde nochmals 5 Minuten bei 3 000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Schließlich wurde das mit dem Z-Gel abgetrennte freie ^{125}J-markierte CEA durch Zugabe von 10 ml Dioxanszintillationslösung im Szintillationszähler (^{3}H-Kanal im Beta-Counter, 1 Minute) bestimmt. Das Verhältnis von gebundenem zu freiem ^{125}J-CEA wurde als Maß für die ursprünglich in den Proben vorhandene Menge an CEA herangezogen. Die Zählausbeute (cpm) der Kontollen mit der bekannten Menge an CEA wurde gegen die Menge zugefügtes CEA in jeder Kontrolle als Standard-Inhibitionskurve aufgetragen. Der CEA-Gehalt der Proben konnte dann

aus der aufgestellten Kurve bestimmt werden.

4. Chromosomen-Bestimmung

Zu ungefähr 2 x 10^6 der zu untersuchenden Zellen wurde einen Tag nach dem Aussäen - wenn voraussichtlich die höchste Mitoseaktivität stattfand - 0,4 µg Kolchizin /ml Medium gegeben (88). Nach 4 - 6 Stunden Inkubation bei 37° C im begasten Brutschrank wurden die Zellen abtrypsiniert, abzentrifugiert und mit PBS^- gewaschen. Danach wurde zu den Zellen 3 ml 0,7 %-ige Natriumcitrat-lösung zugefügt und man ließ die Zellsuspension 20 Minuten im 37° C Wasserbad zum Quellen stehen. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig bei 100 x g abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit einem Methanol-Eisessig-Gemisch im Verhältnis 3 : 1 für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. In der Zwischenzeit legte man mit Aceton fettfrei gemachte Objektträger in Eiswasser. Danach wurden 2 - 3 Tropfen fixierte Zellsuspension schnell auf einen eisgekühlten Objektträger aufgetropft, wodurch es die Tropfen auseinanderzieht ("Spreiten" der Chromosomen). Der Objektträger wurde dann am besten über dem Bunsenbrenner getrocknet. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit folgender Lösung angefärbt: 1 ml Giemsa-Lösung + 1 ml 5 %-ige $NaHPO_4$-Lösung ad 100 ml aqua dest. Man färbte die Zellen ca. 7 Minuten an und spülte dann gut mit fließendem Wasser nach. Die Zellen wurden bei Ölimmersion in 100-facher Vergrößerung des Objektivs betrachtet.

5. Lymphozyten-Zytotoxizitäts-Teste

Die Teste wurden in einer Mikrotestplatte mit 60 Vertiefungen mit je 10 µl Volumen durchgeführt. Die radioaktiv markierten HT 29-Zielzellen wurden in Medium suspendiert und in den Testplatten verteilt, so daß pro 10 µl ca. 500 Zellen vorhanden waren. Weiter wurde nach folgendem Schema verfahren:

Pro Vertiefung der Mikrotestplatten	ca. 500 HT 29-Zielzellen
	Abklopfen der Platten zur Entfernung des Mediums und der nicht festgewachsenen Zellen
Zugabe von	5×10^4 Lymphozyten von Patienten oder gesunden Kontrollpersonen in 10 µl Medium (in insgesamt mindestens 18 Vertiefungen pro Person)
oder	10 µl Medium (Kontrolle), zur Bestimmung der spontanen Freisetzung der Radioaktivität aus den Zellen (in insgesamt mindestens 18 Vertiefungen)
oder	10 µl 1 %-ige SDS-Lösung, um die Zellen zu lysieren und den maximalen Einbau feststellen zu können (in insgesamt mindestens 18 Vertiefungen)

Die mit SDS lysierten Zellen wurden sofort auf Filterpapier pipettiert, um den Gesamteinbau von ^{3}H-Prolin in die Zielzellen zu bestimmen.

Die mit Lymphozyten oder mit Medium behandelten Platten wurden 48 Stunden bei 37° C in einer feuchten Kammer im begasten Brutschrank inkubiert.

Danach wurde das Medium aus den Vertiefungen der Platten pipettiert und zwar so, daß jeweils 6 Einzelproben zu einer Zählprobe auf ein Filterrondell aufgetragen wurden.

Die noch nicht zerstörten Zellen in den Mikrotestplatten wurden durch Zugabe von 10 µl 1 %-ige SDS-Lösung lysiert, um so die noch verbleibende Radioaktivität in den Zellen bestimmen zu können. Auch hierzu wurden jeweils 6 Einzelproben zu einer Zählprobe gesammelt.

Je höher die freigesetzte Radioaktivität war, umso mehr Zellen wurden zerstört und desto niedriger war die verbleibende Radioaktivität in den nicht zerstörten Zellen. Die Gesamtbilanz der so gemessenen Radioaktivität mußte mit dem Gesamteinbau der Zellen übereinstimmen.

Die getrockneten Filterrondelle wurden in Teströhrchen mit je 0,5 ml NCS (9 : 1 verdünnt mit aqua dest.) für 2 Stunden bei 50° C inkubiert.

Nach Zugabe von 10 ml Toluol-Szintillationslösung wurden die Proben im Szintillationszähler bei der Fensterein-stellung A - B = 30 - 1 000 bei einer Verstärkung von 50 % gezählt.

6. Hemmung der Lymphozyten-Zytotoxizität

Die Lymphozyten von Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurden für die Hemmversuche mit verschiedenen Fraktionen von Immunkomplexen, heterologem Immunkomplex und freiem CEA vorinkubiert.

a) Die CEA-Immunkomplex-Fraktionen wurden durch Auftrennen von Patientenseren über Sephadex G 200-Säulen erhalten (81). Ungefähr 5 ml Serum von 2 oder 3 Patienten mit vorher bestimmtem Gehalt an freiem und gebundenem CEA wurde auf eine 70 x 5 cm Säule mit 0,1 molarem Phosphatpuffer p_H 7,2 aufgetragen. Die Fraktionsgröße betrug 50 Tropfen. Nach Messung der optischen Dichte bei 280 nm wurde der IgM-Peak zu einer Fraktion gesammelt, sterilfiltriert und in einer sterilen Amicon-Ultrafiltrationszelle auf das Ausgangsvolumen der Seren eingeengt. Diese Fraktion wurde im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Außerdem wurden auch zur Kontrolle Immunkomplex-Fraktionen von Normalseren in den Hemmtest aufgenommen.

b) Der heterologe Immunkomplex wurde aus 1 ml freiem CEA mit einer Konzentration von ca. 9 µg/ml und 1 ml 1 : 5 verdünntem Anti-CEA-Ziegenserum (Titer 1 : 64 im Ouchterlony-Test) hergestellt. Zum Austesten der geeigneten Konzentration wurde zuvor eine Heidelberger Kurve aufgestellt.

c) Freies CEA wurde in einer Konzentration von 35 µg/ml aus einer Leber-Präparation von Herrn Dr. H.-J. Staab zur Verfügung gestellt.

Jeweils 1×10^6 Lymphozyten wurden in 0,1 ml 2-fach Medium suspendiert und in Probengefäße mit je 0,1 ml der verschiedenen Hemmfraktionen gegeben und 24 Stunden bei 37° C inkubiert.

7. Lymphozyten-Stimulation mit CEA und PHA

Nach der Isolation der Lymphozyten aus dem peripheren Blut wurden diese in Medium (RPMI 1640 Medium + 20 % FBS + 20 mM HEPES-Puffer) suspendiert und ausgezählt. Es wurden dann je 5×10^5 Zellen in 0,1 ml Medium pro Vertiefung der Mikrotestplatten II von Falcon verteilt (37). Zugegeben wurden anschließend als Positiv-Kontrolle verschiedene Konzentrationen von PHA (0,25 µg; 2,5 µg; 10 µg; 15 µg; 25 µg) in 0,1 ml Medium und parallel verschiedene Konzentrationen von CEA (0,25 µg; 2,5 µg; 13 µg) in 0,1 ml Medium. Von jeder Konzentration wurden mindestens 3 Proben angefertigt. Als Negativ-Kontrolle diente die Zugabe von nur Medium zu der Lymphozyten-Suspension. Die Inkubation der Proben wurde bei 37° C im begasten Brutschrank in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zu den mit PHA und einigen nur mit Medium inkubierten Proben wurde nach 2 Tagen 1 µCi ^{3}H-Thymidin in 0,1 ml Medium pro Probe zugefügt, zu den mit CEA und dem Rest der nur mit Medium inkubierten Proben nach 6 Tagen. Die Proben wurden für 20 Stunden mit dem radioaktiven DNS-Baustein markiert.

Zur Aufarbeitung der Proben wurden die Lymphozyten-Kulturen aus den Vertiefungen der Mikrotestplatten in kleine Eppendorff-Gefäße pipettiert und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand der Proben wurde verworfen, das Sediment mit physiologischer Kochsalzlösung aufgewirbelt und nochmals zentrifugiert, um die noch freie Radioaktivität zu entfernen. Nach dem erneuten Verwerfen des Überstandes der Proben wurden die im Sediment befindlichen Lymphozyten mit 1 ml 1 %-iger SDS-Lösung versetzt, wodurch die Zellen lysiert wurden und die DNS freigesetzt werden sollte. Im nächsten Schritt wurden die Proben in 2 ml eiskalte 10 %-ige Trichloressigsäure (TCA), die Natriumpyrophosphat und unmarkiertes Thymidin enthielt, überführt und mindestens 15 Minuten bei 4° C stehen gelassen zur Präzipitation der DNS. Nach kräftigem Schütteln der Proben

wurden diese mit einer Vakuumpumpe auf zuvor in TCA und unmarkiertes Thymidin eingelegte Glasfaserfilter abgesaugt (83). Mit 5 %-iger TCA wurde mehrfach nachgewaschen, danach wurden die Filter getrocknet und 2 Stunden bei 50° C mit 0,5 ml NCS inkubiert und anschließend nach Zugabe von 10 ml Toluol-Szintillationslösung gezählt.

L. Literaturverzeichnis

1. Herberman, R.B.: Biochim. Biophys. Acta 473, 93 - 119 (1977).

2. Burnet, F.M.: Progr. Exptl. Tumor Res. 13, 1 - 27 (1970).

3. Thomas, L.: In: Cellular and humoral aspects of the hypersensitivity state. Ed.: Lawrence, H.S. 529. Hoeber, New York (1959).

4. Hellström, K.E., Hellström, I.: Adv. Cancer Res. 12, 167 - 223 (1969).

5. Hellström, K.E., Hellström, I., Nepom, J.T.: Biochim. Biophys. Acta 473, 121 - 148 (1977).

6. Hellström, I., Hellström, K.E.: Int. J. Cancer 4, 587 - 600 (1969).

7. Hellström, I., Hellström, K.E., Sjögren, H.O.: Cell. Immunol. 1, 18 - 30 (1970).

8. Hellström, I., Hellström, K.E.: Transpl. Proc. 3, 721 - 724 (1971).

9. Sjögren, H.O., Hellström, I., Bansal, S.C., Hellström, K.E.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68, 1372 - 1375 (1971).

10. Baldwin, R.W., Embleton, M.J., Price, M.R.: Int. J. Cancer 12, 84 - 92 (1973).

11. Nind, A.P.P., Matthews, N., Pihl, E.A.V., Rolland, J.M., Nairn, R.C.: Br. J. Cancer 31, 620 - 629 (1975).

12. Agashe, S.S., Gangal, S.G., Nair, P.N.M., Rao, R.S.: Indian J. Med. Res. 66, 824 - 831 (1977).

13. Warnatz, H.: In: Immundiagnosis and Immunotherapy of malignant tumors. Eds.: Flad, H.-D., Herfarth, Ch., Betzler, M. 122 - 128. Springer Verlag, Berlin (1979).

14. Gold, P., Freedman, S.O.: J. exp. Med. 121, 439 - 462 (1965).

15. Gold, P., Freedman, S.O.: J. exp. Med. 122, 467 - 481 (1965).

16. Uphoff, D.E.: J. Natl. Cancer Inst. 45, 1189 - 1195 (1970).

17. Koldovsky, P.: In: Recent results in cancer research Ed.: Rentchnick, P. 11 - 18. Springer Verlag, Berlin (1974).

18. von Kleist, S.: Z. Krebsforsch. 90, 1 - 11 (1977).

19. Staab, H.-J., Kapsopoulou, K., Anderer, F.A., Stumpf, E., Fischer, R.: Med. Welt 27, 864 - 867 (1976).

20. Pfeiffer, R., Reis, H.E., Wittig, H.D., Boettcher, J., Niebel, W., Streicher, H.J., Schmidt, C.G.: J. Cancer Res. Clin. Oncol. 93, 85 - 92 (1979).

21. Gold, P., Gold, M., Freedman, S.O.: Cancer Res. 28, 1331 - 1334 (1968).

22. von Kleist, S., Burtin, P.: Int. J. Cancer 4, 874 - 879 (1969).

23. Denk, H., Tappeiner, G., Eckerstorfer, R., Holzner, J.H.: Int. J. Cancer 10, 262 - 272 (1972).

24. Gold, P.: Cancer 20, 1663 - 1665 (1967).

25. Gold, J.M., Freedman, S.O., Gold, P.: Nature New Biol. 239, 60 - 62 (1972).

26. Gold, J.M., Gold, P.: Cancer Res. 33, 2821 - 2824 (1973).

27. Holburn, A.M., Mach, J.-P., McDonald, D., Newlands, M.: Immunology 26, 831 - 843 (1974).

28. McSween, J.M.: Int. J. Cancer 15, 246 - 252 (1975).

29. Rosenthal, K.L., Palmer, J.L., Harris, J.A., Rawls, W.E., Tompkins, W.A.F.: J. Immunol. 115, 1049 - 1053 (1975).

30. Collatz, E., von Kleist, S., Burtin, P.: Int. J. Cancer 8, 298 - 303 (1971).

31. LoGerfo, P., Herter, F.P., Bennett, S.J.: Int. J. Cancer 9, 344 - 348 (1972).

32. Harvey, S.R., van Dusen, L.R., Douglass, H.O., Holyoke, E.D., Chu, T.M.: J. Natl. Cancer Inst. 61, 1199 - 1203 (1978).

33. Kapsopoulou-Dominos, K., Anderer, F.A.: Clin. exp. Immunol. 35, 190 - 195 (1979).

34. Carrel, S., Delisle, M.C., Mach, J.-P.: Cancer Res. 37, 2644 - 2650 (1977).

35. Shoham, J., Cohen, M.: Br. J. Cancer 40, 234 - 252 (1979).

36. Nairn, R.C., Nind, A.P.P., Pihl, E., Ceredig, R., Jablonka, J.M., Cuthbertson, A.M., Hughes, E.S.R., Rollo, A.J.: Aust. N.Z. J. Surg. 47, 637 - 641 (1977).

37. Dean, J.H., McCoy, J.L., Lewis, D., Appella, E., Law, L.W.: Int. J. Cancer 16, 465 - 475 (1975).

38. Roth, J.A., Morton, D.L.: Cancer Immunol. Immunother. 7, 19 - 23 (1979).

39. Fogh, J., Trempe, G.: In: Human tumor cells in vitro. Ed.: Fogh, J. 115 - 159. Plenum Press, New York (1975).

40. Oldham, R.K., Djeu, J.Y., Cannon, G.B., Siwarski, D., Herberman, R.B.: J. Natl. Cancer Inst. 55, 1305 - 1318 (1975).

41. Baldwin, R.W., Embleton, M.J.: In: International review of experimental Pathology 17, 49 - 95. Academic Press, New York (1977).

42. Hellström, I., Hellström, K.E., Shepard, T.H.: Int. J. Cancer 6, 346 - 351 (1970).

43. Henney, C.S.: In: In vitro methods in cell-mediated and tumor immunology. Eds.: Bloom, B.R., David, J.R. 429 - 436. Academic Press, New York (1976).

44. Kurth, R., Medley, G.: Immunology 29, 803 - 811 (1975).

45. Bean, M.A., Pees, H., Rosen, G., Oettgen, H.F.: Natl. Cancer Inst. Monogr. 37, 41 - 48 (1973).

46. Egan, M.L., Todd, C.W.: J. Natl. Cancer Inst. 49, 887 - 889 (1972).

47. Takasugi, M., Mickey, M.R., Terasaki, P.I.: Cancer Res. 33, 2898 - 2902 (1973).

48. Takasugi, M., Mickey, M.R., Terasaki, P.I.: J. Natl. Cancer Inst. 53, 1527 - 1530 (1974).

49. von Kleist, S., Chany, E., Burtin, P., King, M., Fogh, J.: J. Natl. Cancer Inst. 55, 555 - 557 (1975).

50. Kahan, B.D., Rutzky, L., Berlin, B., Tomita, J., Wiseman, F., Le Grue, S., Noll, H., Tom, B.H.: Cancer Res. 36, 3526 - 3534 (1976).

51. Tom, B.H., Rutzky, L.P., Jakstys, M.M., Oyasu, R., Kaye, C.I., Kahan, B.D.: In Vitro 12, 180 - 191 (1976).

52. Warnatz, H., Eder, E., Lackner, D., Hommel, G.: Z. Immun.-Forsch. 152, 128 - 142 (1977).

53. Tompkins, W.A.F., Schmale, J.D., Mock, R., Tick, N.T., Lock, T., Sidell, B., Palmer, J.L.: J. Natl. Cancer Inst. 62, 503 - 511 (1979).

54. Goldenberg, D.M., Pavia, R.A., Hansen, H.J., Vandevoorde, J.P.: Nature New Biol. 239, 189 - 190 (1972).

55. Tompkins, W.A.F., Watrach, A.M., Schmale, J.D., Schultz, R.M., Harris, J.A.: J. Natl. Cancer Inst. 52, 1101 - 1106 (1974).

56. Breborowicz, J., Easty, G.C., Birbeck, M., Robertson, D., Nery, R., Neville, A.M.: Br. J. Cancer 31, 559 - 569 (1975).

57. Ellison, M.L., Lamb, D., Rivett, J., Neville, A.M.: J. Natl. Cancer Inst. 59, 309 - 312 (1977).

58. Rosenthal, K.L., Tompkins, W.A.F., Frank, G.L., McCulloch, P., Rawls, W.E.: Cancer Res. 37, 4024 - 4030 (1977).

59. David, G.S., Reisfeld, R.A., Chino, T.H.: J. Natl. Cancer Inst. 60, 303 - 306 (1978).

60. Drewinko, B., Yang, L.-Y., Barlogie, B., Romsdahl, M., Meistrich, M., Malahy, M.A., Giovanella, B.: J. Natl. Cancer Inst. 61, 75 - 83 (1978).

61. Perlmann, P., Holm, G.: Adv. Immunol. 11, 117 - 193 (1969).

62. Engers, H.D., MacDonald, H.R.: In: Contemporary topics in immunobiology. Ed.: Weigle, W.O. 5, 145 - 190. Plenum Press, New York (1976).

63. Cerottini, J.C., Brunner, K.T.: In: B and T cells in immune recognition. Eds.: Loor, F., Roelants, G.E. 319 - 336. Wyley & Sons, Chichester, England (1977).

64. Wiedermann, G., Denk, H., Stemberger, H., Eckerstorfer, R., Tappeiner, G.: Cell. Immunol. 17, 440 - 446 (1975).

65. Lustig, H.J., Bianco, C.: J. Immunol. 116, 253 - 260 (1979).

66. Perlmann, P., Cerottini, J.C.: In: The antigens. Ed.: Sela, M. Academic Press, New York (1979).

67. Pape, G.R., Troye, M., Perlmann, P.: J. Immunol. 118, 1919 - 1924 (1977).

68. Perlmann, P.: Behring Inst. Mitt. 63, 7 - 16 (1979).

69. Härfast, B., Andersson, T., Perlmann, P.: J. Immunol. 121, 755 - 761 (1978).

70. Trinchieri, G., Santoli, D., Koprowski, H.: J. Immunol. 120, 1849 - 1855 (1978).

71. Troye, M., Perlmann, P., Larsson, A., Blomgren, H., Johansson, B.: Int. J. Cancer 20, 188 - 193 (1977).

72. Böyum, A.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97, 31 - 46 (1968).

73. Takasugi, M., Klein, E.: Transplantation 9, 219 - 227 (1970).

74. Oldham, R.K., Herberman, R.B.: J. Immunol. 111, 1862 - 1871 (1973).

75. Brunner, K.T., Engers, H.D., Cerottini, J.C.: In: In vitro methods in cell-mediated and tumor immunology. Eds.: Bloom, B.R., David, J.R. 423 - 429. Academic Press, New York (1976).

76. Staab, H.-J., Anderer, F.A., Stumpf, E., Fischer, R.: Dtsch. med. Wschr. 102, 1082 - 1086 (1977).

77. Hellström, I., Warner, G.A., Hellström, K.E., Sjögren, H.O.: Int. J. Cancer 11, 280 - 292 (1973).

78. Sulit, H.L., Golub, S.H., Irie, R.F., Gupta, R.K., Grooms, G.A., Morton, D.L.: Int. J. Cancer 17, 461 - 468 (1976).

79. Mikulski, S.M., Billing, R., Terasaki, P.I.: J. Natl. Cancer Inst. 58, 1485 - 1487 (1977).

80. Huber, S., Lucas, Z.J.: Int. J. Cancer 23, 224 - 232 (1979).

81. Kapsopoulou, K.: Dissertation (1978).

82. Ling, N.R., Kay, J.E.: Lymphocyte Stimulation, 1 - 7, 103 - 115, 159 - 176. North Holland Publishing Company, Amsterdam (1975).

83. Waithe, W.I., Hirschhorn, K.: In: Handbook of experimental immunology, 2. Cellular immunology. Ed.: Weir, D.M. 25.1 - 25.10. Blackwell, Oxford (1973).

84. Rubin, A.D., Johnson, L.J., Brown, S.M.: Progr. exp. Tumor Res. 13, 135 - 180 (1970).

85. Lejtenyi, M.C., Freedman, S.O., Gold, P.: Cancer 28, 115 - 120 (1971).

86. Schreier, M.H., Nordin, A.A.: In: B and T cells in immune recognition. Eds.: Loor, F., Roelants, G.E. 127 - 136. Wyley & Sons, Chichester, England (1977).

87. Henin, J., Gomard, E., Gisselbrecht, S., Levy, J.P.: Br. J. Cancer 39, 51 - 63 (1979).

88. Kruse, P.F., Patterson, M.K. (eds.): Tissue culture, methods and applications. 39 - 58, 768 - 772. Academic Press, New York (1973).

89. Savaris, C.A., Oh, S.K., Pusztaszeri, G., Doos, W.G., Zamcheck, N.: J. Natl. Cancer Inst. 60, 1371 - 1373 (1978).

90. Hansen, H.J., Lance, K.P., Krupey, J.: Clin. Res. 19, 143 - 147 (1971).

91. Hansen, H.J., Miller, O.N., Tan, C.H.: Amer. J. Clin. Nutr. 19, 10 - 16 (1966).

92. Grosser, N., Thomas, D.M.P., Flores, M., Mac Farlane, J.K.: Cancer Immunol. Immunother. 7, 263 - 269 (1980).

93. Staab, H.-J., Anderer, F.A., Stumpf, E., Fischer, R.: Klin. Wochenschr. 58, 125 - 133 (1980).

Lebenslauf

Am 28. November 1951 wurde ich als Tochter des Bürgermeisters Georg Thierer und seiner Ehefrau Klara in Göppingen geboren. Nach der Grundschule in Rechberghausen (1959-1963) besuchte ich das Mörike-Gymnasium in Göppingen bis zum Abitur im Juni 1971. Von 1971 bis 1976 studierte ich Biologie an der Universität Tübingen. Im Juni und Oktober 1976 legte ich die Diplomprüfungen in Zoologie, Mikrobiologie, Biochemie und Pharmakologie ab. Anschließend arbeitete ich bis im August 1977 an meiner Diplom-Arbeit im Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen bei Prof. Dr. D. Winne. Seit September 1977 arbeite ich unter Anleitung von Prof. Dr. F.A. Anderer am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen an einer Dissertation über das Thema: " Versuche zur Charakterisierung der zellvermittelten Anti-Tumor-Immunität bei Patienten mit Karzinomen des Gastrointestinaltraktes".

Meine akademischen Lehrer waren:

F.A.Anderer, V.Braun, K.G.Grell, J.Guglielmi, E.Kulzer, E. Lindner, D.Mecke, G.F.Meyer, H.Metzner, F.P.Möhres, H.Remmer, H.Ritter, A.Rieker, W.Rüdorff, E.Sander, J.Schmitt, B.Schwemmle, H.Seiler, M.Siess, H.Stegmann, G.Weitzel, P.Wenk, D.Winne, H. Zähner

Druck: D. Gräbner, 8602 Altendorf - Tel. 09545/8791